

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP04/019461

International filing date: 17 December 2004 (17.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-420046  
Filing date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

18.02.2005

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2003年12月17日

出願番号 Application Number: 特願2003-420046

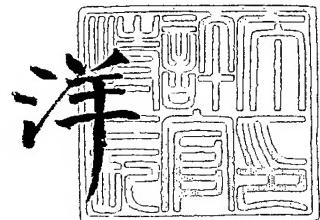
[ST. 10/C]: [JP2003-420046]

出願人 Applicant(s): サントリー株式会社  
サントリーフラワーズ株式会社

2005年 3月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



**【書類名】** 特許願  
**【整理番号】** 1034724  
**【提出日】** 平成15年12月17日  
**【あて先】** 特許庁長官 今井 康夫 殿  
**【国際特許分類】** C12N 15/29  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サントリー株式会社 研究センター内  
**【氏名】** 田中 良和  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サントリー株式会社 研究センター内  
**【氏名】** 小埜 栄一郎  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サントリーフラワーズ株式会社 研究センター内  
**【氏名】** 中村 典子  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サントリーフラワーズ株式会社 研究センター内  
**【氏名】** 水谷 正子  
**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 000001904  
**【氏名又は名称】** サントリー株式会社  
**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 502275942  
**【氏名又は名称】** サントリーフラワーズ株式会社  
**【代理人】**  
**【識別番号】** 100099759  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 青木 篤  
**【電話番号】** 03-5470-1900  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100077517  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 石田 敬  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100087871  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 福本 積  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100082898  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 西山 雅也  
**【手数料の表示】**  
**【予納台帳番号】** 209382  
**【納付金額】** 21,000円  
**【提出物件の目録】**  
**【物件名】** 特許請求の範囲 1  
**【物件名】** 明細書 1

【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0306634

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

**【請求項 2】**

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する請求項 1 記載の遺伝子。

**【請求項 3】**

配列番号 1 に記載する塩基配列の一部または全部に対して、5 x SSC、50°C の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 記載の遺伝子。

**【請求項 4】**

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対して 1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。

**【請求項 5】**

配列番号 1 に記載する塩基配列の一部または全部からなるDNAとストリジエントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項 1 記載の遺伝子。

**【請求項 6】**

ゴマノハグサ科由来である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子。

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

**【請求項 8】**

請求項 7 に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質。

**【請求項 10】**

請求項 7 に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、またはそれら植物体の組織。

**【請求項 12】**

請求項 11 に記載の植物体の切り花。

**【請求項 13】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を用いてカルコン類の4' 位に糖を転移する方法。

**【請求項 14】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体。

**【請求項 15】**

花色が黄色味を帯びていることを特徴とする請求項 14 に記載の植物体。

**【請求項 16】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法。

**【請求項 17】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

**【請求項18】**

請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

**【請求項19】**

請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン3-水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】フラボノイド合成系の制御による黄色の花の作製方法

【技術分野】

#### 【0001】

本発明はカルコン類に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、および当該遺伝子を利用して花色が変換された植物に関するものである。更に詳しくは、カルコン類の4'配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、好ましくはキンギョソウのカルコン類の4'配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、及びこれらとオーレウシジン合成酵素（以下、ASという）遺伝子を共発現させオーロン類を蓄積させることにより花の色を黄色く改変する手法に関するものである。

【背景技術】

#### 【0002】

花色は人が花卉を鑑賞あるいは購入する際に重要な形質であり、古くから様々な色の花が育種されてきた。単一の種ですべての色の花をもつ場合はむしろ稀であるが、これは花色として発現する色素の生合成が遺伝的に規定されていることによる。交配育種では利用できる遺伝子資源が交配可能な近縁種に限定されているため、交配によって目的の種においてすべての色の花を作ることは実質的に不可能であった。最近になって、遺伝子組換え技術を利用して、花色素を合成する遺伝子のある植物から取得し、当該遺伝子を別の種で発現することにより花の色を改変することが可能となった(Plant Cell Physiol. 39, 1119 (1998)、Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 (2001))。

#### 【0003】

花の色のうち、橙、赤、紫、青は主にアントシアニンと総称されるフラボノイドに由来する。黄色は、カロチノイド、ベタレインといったフラボノイド以外の化合物に由来することが多いが、一部の植物種の黄色はフラボノイドに由来する。たとえば、黄色カーネーションには4,2',4',6' - テトラヒドロキシカルコン（以下THC）の2'配糖体が花弁中に存在することが知られている(Phytochemistry 5, 111 (1996))。また、キンギョソウ、リナリアにはTHCの4'配糖体が存在する。

#### 【0004】

カルコン類としては、THCのほか、ブテイン、イソリクリチゲニン等及びこれらの誘導体の配糖体が知られており、カーネーション、アサガオ、ボタン、スター、ムギワラギク、ニチニチソウ、シクラメン、ペチュニアはTHC、キンギョソウやスターチスは3,4,2',4',6' - ペンタヒドロキシカルコン、コスモス、キクイモはブテイン、ダリアはブテインおよびイソリクリチゲニンをアグリコンとする配糖体を含んでいる。また、キンギョソウ、リナリア、アサガオなどの限られた種にはオーレウシジン（以下AU）、ブラックティアチンなどのオーロン類と呼ばれる黄色の花色素が存在する。

#### 【0005】

オーロンの吸収極大は399nmから403nmであるのに対し、カルコンの吸収極大は372nmから382nmであるから、両者の色調は異なり、蛍光のためオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈する（バイオホルティ 1 49-57 (1990) 誠文堂新光社）。一般にカルコン類、オーロン類、アントシアニンは植物細胞中では配糖体として液胞中に蓄積する。アントシアニンの生合成経路はよく研究されており、アントシアニンの合成に関与する酵素やそれらをコードする遺伝子が知られている(Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I (ed. Sankawa) pp713-748, Elsevier, Amsterdam (1999))。

#### 【0006】

フラボノイドの生合成経路は高等植物には広く存在しており、また、種間で共通している。THCは、3分子のマロニルCoAと1分子のクマロイルCoAからカルコン合成酵素の触媒作用により生合成される。THCは薄い黄色を呈するが、植物においては、通常カルコン異性化酵素（CHI）により速やかに無色のナリンゲニンに変換される。また、THCは中性付近のpHではきわめて不安定であり、自発的に閉環してナリンゲニンに変換する。THCが植物細胞中で安定に存在、すなわち黄色を安定に呈するためには、THCの2'位が糖により修飾さ

れ閉環できなくなることが必要である。この反応はTHCの2'にグルコースを転移する酵素(UDP-グルコース:4,2',4',6'-テトラヒドロキシカルコン 2'-糖転移酵素 以下2' CGT)により触媒される。

#### 【0007】

THC2'配糖体はカーネーション、シクラメンなどに存在することから、2' CGTもこれらの花に存在すると予測される。したがって、2' CGT遺伝子を得る事ができれば、この酵素遺伝子を植物において発現し、THC 2' 配糖体を蓄積させ、黄色の花を作成できると考えられていた(Biotechnology of Ornamental Plants, Edited by Geneve, Preece and Merkle, pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997))。また、THC 2' 配糖体を十分蓄積し黄色を発色させるためにはCHI遺伝子が欠損し、THCからナリンゲニンへの酵素的変換が抑制されること、さらに明瞭な黄色の発色のためにはCHI遺伝子と他にフラバノン3-水酸化酵素(以下、F3Hという)遺伝子も欠損する必要があることが知られていた(Plant Cell Physiol. 43, 578 (2002))。

#### 【0008】

これまでにカーネーションの2' CGT遺伝子をクローニングしたという報告はある(Plant Cell Physiol. 44, s158 (2003))がその配列は開示されていない。また、カーネーションから2' CGT活性をコードする遺伝子を取得し、ペチュニアで発現させ、ペチュニア花弁においてTHC 2' 配糖体を蓄積した例もある(PCT/JP03/10500)。しかしながら、2' CGTによって生成するTHC 2' 配糖体は、その化学構造上、オーロン合成の前駆体となることが不可能となる。また、前述のようにTHC2' 配糖体の蓄積では、うすい黄色の花弁にしかならない。

#### 【0009】

THCの2'位の水酸基がメチル化された化合物が蓄積した場合も花弁は淡い黄色となることは知られているが、このメチル化を触媒する酵素やその遺伝子の実体は知られていない。ダリア、コスモスなどの黄色の品種には6' -デオキシカルコンが含まれる。マメ科植物においては、6' -デオキシカルコンは5-デオキシフラボノイドの前駆体であり、カルコンシンターゼ(CHS)とカルコンリダクターゼ(CHR)の触媒作用により生合成される。ペチュニアにアルファルファのCHR遺伝子を導入したところ、ブティンなどの6' -デオキシカルコン類が生成したことが報告されているが、当該CHR遺伝子を白い花をもつペチュニアに導入した場合、つぼみの段階ではごく薄い黄色が見られたが、開花時にはほとんど白であり、産業上有用な黄色の花を作出するに至らなかった(Plant J. 13, 259 (1998))。

#### 【0010】

前述のようにカルコン配糖体よりもオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈するため、オーロンを蓄積させる方法を開発できれば産業上きわめて有用である。オーロンの生合成に関わる酵素の1つであるASとその遺伝子については既に報告されている(Science, 290, 1163 (2000))。この報告によればASはTHC、ペンタヒドロキシカルコン(PHC)や、これらの配糖体を基質としてAU、ブラックティアチンならびにこれらの配糖体を生成する。しかしながら、AS遺伝子を用いてAUやブラックティアチンなどのオーロンを生物において蓄積させた報告はない。

#### 【0011】

我々はAS遺伝子を構成的プロモーターの制御下に結合したバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウム法によりペチュニアやトレニアにAS遺伝子を導入したが、オーロンの蓄積は認められなかった。一方、アントシアニジンの3位の配糖化がアントシアニンの液胞への移行に必須であると報告されているが(Nature 375, 397 (1995))、これと同様にオーロンの配糖化が液胞への移行シグナルとして必須である可能性が考えられる。実際に黄色キンギョソウ花弁に蓄積している主要なオーロンはAUの6位の配糖化物である。そこで、AUの6位に配糖化活性を示すGT(AU6GT)を取得し(WO 00/49155)、このAU6GT遺伝子とAS遺伝子を共にペチュニアで構成的に発現させたが、オーロンの蓄積は見られなかった。

#### 【0012】

フラボノイドやアントシアニンの生合成に関与する酵素は細胞内では細胞質か小胞体に存在すると考えられている。これらの酵素の働きでフラボノイドやアントシアニンは液胞の外側、すなわち細胞質側で合成され、配糖化された後、液胞に輸送される(Natural Product Reports 20, 288, (2003))。ところが、鋭意検討の結果、ASは例外的に液胞内に存在することを本発明者らは明らかにした。このことから生体内では、配糖化されたカルコンが液胞に輸送され、これを基質として液胞内でオーロンが合成されるのではないかという着想を得た。

#### 【0013】

前述のように黄色キンギョソウ花弁の液胞に蓄積する主要なオーロンはAU 6位配糖化物である。AUの6位はTHCの4'位に対応し、黄色キンギョソウ花弁にはTHC 4'配糖体も存在する。これらに基づき、細胞質で合成されたTHCの4'位が配糖化された後、液胞に輸送され、それを基質としてASによってAU 6位配糖化物が合成されるという一連のオーロン合成経路を推測するにいたった。よってAU 6位配糖化物などのオーロンを異種植物で合成させるためには、THC4'配糖体を合成することが必須であると考えた。そのためには、THCの4'位を配糖化するUDP-グルコース：4,2',4',6'-テトラヒドロキシカルコン4'配糖化酵素、以下4' CGT)が必要であり、4' CGT遺伝子を取得する必要がある。しかしながら、4' CGT遺伝子は今までにクローニングされた報告もなく、4' CGTが単離された報告もない。

#### 【0014】

フラボノイドをはじめ多様な化合物の糖転移反応を触媒して配糖体を生成する酵素は、一般に糖転移酵素(GT)と呼ばれ、植物は、基質及び転移する糖の種類に対応した多様な分子種のGTおよびそれらをコードする遺伝子を持っている。GTは通常UDP-グルコースをグルコース供与体として利用するので、そのアミノ酸配列中にUDP-グルコースに結合するモチーフを含んでいる(Plant Physiol. 112, 446 (2001))。このモチーフを有するGT遺伝子は、すでにゲノムの全構造が明らかになっているアラビドプシスには99種あることが知られている(J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。

#### 【0015】

また他の植物からも、いくつかのGTのアミノ酸配列と機能が解明されている。フラボノイドあるいはアントシアニジンの3位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素(UDP-グルコース：フラボノイド3-糖転移酵素、以下3GT)の遺伝子は、シソ、トウモロコシ、リンドウ、ブドウなどから得られている(J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999); J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。また、アントシアニンの5位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素(UDP-グルコース：アントシアニン5-糖転移酵素、以下5GT)の遺伝子は、シソ、バーベナなどから得られている(J. Biol. Chem., 274, 7405, (1999))。

#### 【0016】

3GTや5GTのアミノ酸配列の解析から、同一機能を有するGTは植物種が異なっていてもアミノ酸配列は類似していること、すなわちファミリーを形成することが知られている(J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。よって、既知のGTと同一機能を有する酵素(オルソログ)を他の植物種から得る事は、現在の技術水準からすれば困難ではない。たとえば、ペチュニアの5GT遺伝子は、シソの5GT遺伝子を用いてクローニングされた(Plant Mol Biol. 48, 401 (2002))。しかしながら、同一の機能を有する酵素が全く得られない新規GT遺伝子の取得には多大の試行錯誤と困難が伴う。

#### 【0017】

前述のように全ゲノム構造が明らかになっているアラビドプシスであるが、その花弁は白く、カルコン4'配糖体の蓄積は報告されていない。したがって、アラビドプシスのGT遺伝子の情報をを利用して4' CGT遺伝子のクローニングを行うことはできない。また、カーネーションから2' CGTが単離(PCT/JP03/10500)されているが、4' CGT遺伝子と2' CGTの相同性が高いことは必ずしも期待できない。なぜならば、基質が共通であっても糖を付加する位置が異なれば、それぞれのGTの生化学的および分子生物学的特性は大きく異なる可能性が考えられるからである。これは、3GTと5GTが別のGTファミリーに属することによつ

ても支持される。また、ベタニジンの5GTと6GTは基質が共通にも関わらず、アミノ酸同一性は19%しかないことが報告されている (Planta 214, 492 (2002))。

#### 【0018】

事実、共通のアントシアニジン骨格の3位、5位または3'位に糖を転移する各GTは、GTスーパーファミリーの中の異なるファミリーに属し、これらのファミリー間のアミノ酸同一性は20%程度に過ぎない (Plant Physiol. 132, 1652, (2003), Natural Product Reports 20, 288, (2003))。4' CGT 遺伝子のみならず、新規の遺伝子を取得するには一般にいくつかの方法が考えられる。たとえば花弁で発現しているバラの香り成分の合成に関与する酵素の遺伝子は、遺伝子を網羅的に配列決定し、それらの構造、発現様式、大腸菌での発現によって同定された (Plant Cell. 14, 2325 (2002))。そこで4' CGT 遺伝子を同定するためにオーロンおよびカルコン4'配糖体を蓄積する黄色キンギョソウ（品種バタフライイエロー）花弁由来のcDNAライブラリーからランダムに5000クローンを選び、これらの塩基配列を決定した。

#### 【0019】

公知のDNAデータベースを用いたホモロジー検索の結果、3種のGT遺伝子が得られた。そのうち2種は3GT遺伝子および前述の、AU6GTをコードする遺伝子 (WO 00/49155)、残る1種が新規GT(pSPB662と命名)であった (配列番号: 13)。しかし、pSPB662にコードされるGTはTHCに対する配糖化活性を示さず、THC4' GTではないことが明らかとなった。また、前述のように同遺伝子とオーロン合成酵素遺伝子とを共にペチュニアにおいて高発現させた結果、カルコン配糖体およびオーロンの生成は確認されず、花色についても変化は認められなかった。これらの結果から、5000クローン程度のランダムスクリーニングによってはカルコン配糖化酵素遺伝子を単離できないことが示唆され、4' CGT 遺伝子を取得するのは、困難であった。

#### 【0020】

【特許文献1】PCT/JP03/10500

【特許文献2】WO 00/49155

#### 【0021】

【非特許文献1】Plant Cell Physiol. 39, 1119 (1998)

【非特許文献2】Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 (2001)

【非特許文献3】Phytochemistry 5, 111 (1996)

【非特許文献4】バイオホルティ 1 49-57 (1990) 誠文堂新光社

【非特許文献5】Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I (ed. Sankawa ) pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999)

【非特許文献6】Biotechnology of Ornamental Plants, Edited by Geneve, Preece and Merkle, pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997)

【非特許文献7】Plant Cell Physiol. 43, 578 (2002)

【非特許文献8】Plant Cell Physiol. 44, s158 (2003)

【非特許文献9】Plant J. 13, 259 (1998)

#### 【0022】

【非特許文献10】Science, 290, 1163 (2000)

【非特許文献11】Nature 375, 397 (1995)

【非特許文献12】Natural Product Reports 20, 288, (2003)

【非特許文献13】Plant Physiol. 112, 446 (2001)

【非特許文献14】J. Biol. Chem. 276, 4338, (2001)

【非特許文献15】J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999)

【非特許文献16】Plant Mol Biol. 48, 401 (2002)

【非特許文献17】Planta 214, 492 (2002)

【非特許文献18】Plant Physiol. 132, 1652, 2003 (2003)

【非特許文献19】Plant Cell. 14, 2325 (2002)

#### 【発明の開示】

**【発明が解決しようとする課題】**

**【0023】**

本発明は、カルコン類の4'位の水酸基に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子、好ましくはカルコン類の4'位の水酸基に特異的に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子を提供することにある。さらに当該GT遺伝子を用いて花色を改変、好ましくは黄色に変化させた植物体を提供することにある。

**【課題を解決するための手段】**

**【0024】**

前述のように、4'CGTの生化学的あるいは分子生物学的な性質は知られておらず、酵素が精製されたり、その遺伝子がクローニングされたこともなかった。発明者らは、黄色キンギョソウ（バタフライイエロー）の花弁cDNAライブラリーからGTファミリーの保存アミノ酸配列に対応した塩基配列を有するプローブを用いて、当該保存アミノ酸配列の塩基配列を有するGT遺伝子を数十種類取得した。さらに、当該GT遺伝子群を各々大腸菌で発現させ、その中に、当該大腸菌の抽出液中にカルコンの4'位にグルコースを転移する活性、すなわち4'CGT活性を確認し、クローン化した遺伝子が4'CGTをコードすることを確認した。この遺伝子を植物中で発現させ、花色を改変し、本発明を完成した。

**【0025】**

すなわち、本発明は、(1)カルコン類の4'位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はまた、(2)配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する前記(1)記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、(3)配列番号1に記載する塩基配列の一部または全部に対して、5×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4'位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする前記(1)記載の遺伝子を提供する。

**【0026】**

本発明はまた、(4)配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4'位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記(1)記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、(5)配列番号1に記載する塩基配列の一部または全部からなるDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4'位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記(1)記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、(6)ゴマノハグサ科由来である前記(1)～(5)のいずれか1項に記載の遺伝子を提供する。

**【0027】**

本発明はまた、(7)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、(8)前記(7)に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、(9)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質を提供する。

本発明はまた、(10)前記(7)に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4'位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法を提供する。

本発明はまた、(11)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、またはそれら植物体の組織を提供する。

**【0028】**

本発明はまた、(12)前記(11)に記載の植物体の切り花を提供する。

本発明はまた、(13)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子を用いてカル

コン類の4'位に糖を転移する方法を提供する。

本発明はまた、(14)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体を提供する。

本発明はまた、(15)花色が黄色味を帯びていることを特徴とする前記(14)に記載の植物体を提供する。

#### 【0029】

本発明はまた、(16)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(17)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(18)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

本発明はまた、(19)前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン3-水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0030】

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号2に記載したアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質も、もとのタンパク質と同等の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、4'CGT活性を保持しているタンパク質である限り、配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質および当該タンパク質をコードする遺伝子も本発明に属する。なお、複数個とは、2～30個、好ましくは2～9個をいう。

##### 【0031】

本発明はまた、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAに対し、5xSSC、50℃といった比較的温和な条件下でハイブリダイズし、かつ4'CGT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子に関するものである。さらに、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAに対しストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ4'CGT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も、本発明の技術的範囲に属する。ここでいうストリンジェントな条件とは、例えば2xSSC、65℃があるが、ハイブリダイゼーションの条件はプローブに用いるDNAの長さ及び塩基組成によって異なるから、この条件に限定されない。

##### 【0032】

上述のようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、好ましくはゴマノハグ科由来のもの、さらに好ましくはキンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の遺伝子が挙げられるが、植物由来に限定されるものではない。すなわち、本発明の4'CGT遺伝子は、キンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の4'CGT遺伝子に限定されるものではなく、カルコン類4'位配糖体を含む他の生物種に由来する4'CGT遺伝子であれば、いずれでも黄色の花を育種するのに用いることができる。

また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

##### 【0033】

GTの保存領域の相同性を有する遺伝子は実施例に示すように、例えばキンギヨソウやリナリア花弁から作製したcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、配列番号2に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有するGTをコードするDNAは、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAを用いて、公知の部位特定変異誘発法やPCR法を用いて合成することができる。例えばアミノ酸配列を改変したいDNA断片をcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望のアミノ酸配列の改変に対応したプライマーを用い、部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望のアミノ酸配列の改変に対応したDNA断片を得ることができる。その後、この改変を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

#### 【0034】

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分のアミノ酸配列に対応するDNA断片を合成し、連結すればよい。

#### 【0035】

このようにして得られたGT遺伝子を大腸菌又は酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、当該大腸菌又は酵母の抽出液中の4' CGTの活性を測定することにより、得られたGT遺伝子が4' CGTを示すタンパク質をコードすることを確認することができる。4' CGTの活性は、例えば実施例3に記載したように、逆相樹脂に4' CGTの基質となるカルコン類を吸着させ後、当該逆相樹脂をGT遺伝子で形質転換した大腸菌又は酵母の抽出液と反応させ、生成したカルコン4' 配糖体を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析することにより測定できる。

#### 【0036】

さらに、得られた4' CGT遺伝子を適切な宿主細胞で発現させることにより、当該遺伝子の産物である4' CGTタンパク質を得ることができる。あるいはまた、配列番号2に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を有するタンパク質又はペプチドに対する抗体を用いて他の生物の4' CGT遺伝子を発現クローニングによって得ることもできる。

#### 【0037】

本発明はまた、4' CGT遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア(Escherichia)属に属する細菌、例えば大腸菌(Escherichia coli)、バシルス(Bacillus)属微生物、例えばバシルス・スブシルス(Bacillus subtilis)など従来公知の宿主細胞を用いることができる。

#### 【0038】

真核細胞としては、例えば真核微生物、好ましくは酵母または糸状菌が使用できる。酵母としては例えばサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)等のサッカロミセス(Saccharomyces)属酵母が挙げられ、また糸状菌としては、例えばアスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)等のアスペルギルス(Aspergillus)属微生物、及びペニシリウム(Penicillium)属微生物等が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞も宿主細胞として使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

#### 【0039】

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の生物種に依存したプロモーターおよびターミネーター等の発現制御領域、及び複製起点等を含有する。細菌用、特に大腸菌における発現ベクターのプロモーターとしては、従来公知のプロモーター、例えばtrcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター等が使用できる。また、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05プロ

ロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trpC等のプロモーターが使用できるが、これらのプロモーターに限定されるものではない。また動物細胞用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も従来公知の方法に従って行うことができる。

#### 【0040】

植物の発現ベクターの構築は、例えばアグロバクテリウムを用いる場合にはpBI121などのバイナリーベクターを、パーティクルガンを用いる場合にはpUC19などの大腸菌ベクターを用いることができる。さらに、当該植物の発現ベクターで形質転換された植物細胞を例えば抗生物質耐性遺伝子などのマーカー遺伝子を用いて選抜し、適切な植物ホルモン等の条件を用いて再分化させ、4' CGT遺伝子で形質転換された植物体を得ることができる。当該形質転換植物を栽培することにより、開花させ、花色が改変された植物体を得ることができる。

#### 【0041】

発現ベクターによって形質転換された宿主細胞又は形質転換植物体を培養又は栽培し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする4' CGTタンパク質を回収、精製することができる。

#### 【0042】

本発明はキンギョソウやリナリアの4' CGT遺伝子のみに限定されるものではなく、4' CGTの起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、4' CGT活性を有していれば同様に花色改変へ利用できる。本発明はまた、4' CGT遺伝子の利用に関するものであり、4' CGT遺伝子を植物体に導入・発現することにより、花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体又はこれら植物体の組織も本発明の技術的範囲であり、組織の形態としては切り花であってもよい。また4' CGT遺伝子のみでなく、4' CGTに加えAS遺伝子も共に植物体へ導入、発現させたり、さらに加えて、宿主が本来有するフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体またはこれら植物体の組織も本発明の技術範囲であり組織の形態としては切花であってもよい。

#### 【0043】

現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法、コサプレッション法、RNA法などによって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カラシコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、レンギョウ、ベゴニア、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワーなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例】

##### 【0044】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、W096/25500あるいはMolecular Cloning(Sambrook et.al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989)に記載されている方法に従った。

##### 実施例1. 黄色キンギョソウ花弁cDNA ライブライマーの構築

黄色のキンギョソウである品種バタフライイエローの新鮮な花弁5 g から論文(Science 290, 1163 (2000))に記載のようにしてcDNAライブライマーを構築した。得られたライブライマーは、 $1.6 \times 10^5$  plaque forming unitからなっていた。

##### 【0045】

##### 実施例2. 4' CGT遺伝子のスクリーニング1

すでに開示されているGTのアミノ酸配列を比較し、これらのアミノ酸配列の保存領域に相当する塩基配列を増幅し、これをプローブとして実施例1で述べたキンギョソウcDNAライブラリーをスクリーニングした。

プローブに用いたGTはアサガオ由来のUDP-グルコース：アントシアニジン3-グルコシド糖転移酵素(3GGT)（特開2003-289884）、ペチュニア由来3GT(Plant Mol. Biol. 48, 401, (2002))、バーベナ由来5GT(J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999))、コガネバナGT(SBGT, Planta 210, 1006 (2000))、リンドウ由来のUDP-グルコース：アントシアニン3'-糖転移酵素(3' GT) (Plant Physiol. 132, 1652, (2003))配列の5種である。それぞれGTについて、保存された領域の配列を増幅できるように1組のオリゴヌクレオチドを合成した。これらオリゴヌクレオチドの配列を配列番号：3～12に示す。

#### 【0046】

アサガオ3GGT

配列番号3 : 5' -GAA ATG GTC GGA TTG GCT GGG-3'

配列番号4 : 5' -ACC TCC ACC CCA ACT TTC AGG-3'

ペチュニア3GT

配列番号5 : 5' -GAT GCA TAA TTT GGC TAG AAA AGC-3'

配列番号6 : 5' -CCA ATT TGC CAA ACA CTT TCC-3'

#### 【0047】

バーベナ5GT

配列番号7 : 5' -TGC CTC GAA TGG TTG AGC ACG-3'

配列番号8 : 5' -CTC TCA CTC TCA CAC CCG-3'

コガネバナGT

配列番号9 : 5' -CAC GAA TGC TTA GCA TGG CTC-3'

配列番号10 : 5' -CTT ATT GCC CAC TGA AAC CCC-3'

リンドウ3' GT

配列番号11 : 5' -TGT CTG AAT TGG CTT GAT TCC-3'

配列番号12 : 5' -AAC CCA CAG AAA CCC CTG TTC-3'

#### 【0048】

プローブはノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用いて、製造者が推奨する条件に従いPCRによりラベルした。この際、鋳型として1ngのそれぞれのcDNAを含むプラスミドを用い、プライマーとして、上記の各遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド100ngを使用し、95°C1分、55°C1分、72°C2分からなる反応を1サイクルとし、これを25サイクル行った。各遺伝子のPCR増幅産物を等量混合したものをハイブリダイゼーションのプローブとして、実施例1に記載のキンギョソウ由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。

#### 【0049】

ハイブリダイゼーションは、30%ホルムアミド、1%SDSを含む5XSSC中、37°Cで一晩行い、フィルターの洗浄は5x SSC, 1%SDSを用いて55°Cで30分間行った。スクリーニングによるポジティブシグナルの検出はノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用い、製造者の推奨する方法に従った。約30万プレートをスクリーニングし、最終的に10種類の完全長糖酵素転移酵素遺伝子を含むクローンを得た(pSPB264, 1621, 1620, 1622, 1610, 1609, 1617, 1615, 660, 658)。DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems)を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によってこれらのcDNA配列を決定した。これらcDNAのアミノ酸コード領域の塩基配列を配列番号14～23に示した。

#### 【0050】

##### 実施例3. 大腸菌を用いたカルコンGT活性の測定

###### 3-1 大腸菌発現ベクターの構築と大腸菌におけるGTの発現

実施例2で得られた10種類のcDNAにコードされるGT活性を大腸菌発現系を用いて解析した。まず、各cDNAの大腸菌発現コンストラクトを作製した。PCR法によって各cDNAの暫定

的開始メチオニンコドンに重なる様にNcoIサイトを導入し、開始メチオニンから終止コドンに至る領域を大腸菌発現ベクターpQE61(QIAGEN)の NcoIおよびKpnI、またはNcoIおよびEcoRVサイトに連結した。

#### 【0051】

開始メチオニンに重なるNcoIサイト導入のためのPCR反応液(25 $\mu$ l)は、各GT cDNAを鑄型とし、開始メチオニン部位に重なるNcoI認識配列を導入したプライマー、及びストップコドン付近の下流から上流に向けてのプライマー各0.2 pmol/ $\mu$ l, 1x ExTaq buffer(Takara), 0.2mM dNTPs, ExTaq polymerase 1.25 Uからなる。反応は、94°Cで5分反応させた後、94°C、1分、55°C、1分、72°C、2分の反応を28サイクル行い、最後に72°Cで5分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOPO vector (INVITROGEN)に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。増幅されたDNA断片のDNA配列を解析し、PCR反応によるエラーがないことを確認したのち、大腸菌発現ベクター p QE61(QIAGEN)に導入した。

#### 【0052】

例えばp SPB1617にコードされるcDNA(配列番号：20)については、配列表に示した1617BamHINcoI-FW(配列番号：24)ならびに1617XhoIKpnI-RV(配列番号：25)の二種のプライマーを用いてPCRを行い、開始メチオニン部位に重なるNcoIサイトと、終始コドン後にKpnIサイトを導入した。増幅されたDNA断片をpCR2.1 TOPO vectorにサブクローニングした。塩基配列にPCRによるエラーがないことを確認後、NcoIとKpnIで切り出したDNA断片をpQEのNcoIおよびKpnIサイトに連結し、p SPB1617cDNAの大腸菌発現ベクターであるpSPB1642を得た。同様にして10種類のGT cDNAの大腸菌発現ベクターを構築した。

#### 【0053】

1617BamHINcoI-FW

配列番号24: 5' -ggg gga tcc atg gct agt gag agc caa ata-3'

1617XhoIKpnI-RW

配列番号25: 5' -ccc ctc gag ggt acc tca caa aac att att cac gac-3'

各発現ベクターを大腸菌株 JM109 (TOYOBIO)に導入し、37°Cで終濃度20ug/mlのアンピシリンを含むLB培地で一晩前培養した。前培養液の1mlをアンピシリン50 $\mu$ g/ml, カザミノ酸0.5%を含むM9培地、50mlに加えA600=0.6-1.0に達するまで培養した後、IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を終濃度0.1mMになるよう加え、さらに27°Cで一晩振とう培養し、3000rpm, 10分間、4で遠心し、集菌した。菌体を10mlの緩衝液(30mM Tris-HCl pH7.5、30mM NaCl)に懸濁し、SONIFIER 250 (BRANSON社)での超音波処理により大腸菌を破碎した後、15,000rpm, 10分、4°Cで遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とし、以下の活性測定に用いた。

#### 【0054】

##### 3-2 酵素活性の測定

蒸溜水で平衡化済みの逆相樹脂、TOYOPEARL HW-40F(TOSOH) 1mlにTHC(500 $\mu$ g/mlエタノール溶液)を蒸溜水で希釈しながら負荷した後、水洗することにより、樹脂に固定された基質THCを得た。この樹脂固定されたTHC 100 $\mu$ lに3-1で得られた粗酵素液200 $\mu$ lおよび5mM UDP-glucose 10 $\mu$ lを加え、30°Cで1時間反応させた。遠心して上清を除去後、沈殿した樹脂を水洗し、0.1% TFA (Trifluoroacetic acid)を含む50%アセトニトリル300 $\mu$ lに懸濁し、超音波処理によりフラボノイドを樹脂より遊離した。15,000 rpm、5分、4°Cで遠心分離し、得られた上清をフィルター(ポアサイズ0.45mm、4 mm Millex-LH、ミリポア)を用いて不溶物を除去して、上清を液体高速クロマトグラフィー(以下HPLC)で分析した。カルコンおよびその配糖体の分析条件は以下の通りである。

#### 【0055】

カラムはDevelosil C-30-UG-5(4.5mm  $\phi$  x150mm、野村化学)を用いて、移動相にはA液として0.1%TFAを含むH<sub>2</sub>O、B液として0.1%TFAを含む90%アセトニトリルを用い、B液20%からB液70%の直線濃度勾配10分間の溶出後、B液70%で5分間維持した。流速は0.6ml/min.、検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A(島津製作所)による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。この条件で、THCは保持時間10.7分に溶出され、その2'配

糖体および4'配糖体は8.5分に溶出されることをTHC及びTHCの2'および4'配糖体の標準を用いて確認した。

#### 【0056】

pSPB1642を発現する大腸菌の抽出液を反応させたところ、基質THCに加え、8.5分に溶出される新たな生成物が検出された。これらはpQE61ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液およびpSPB1642を発現する大腸菌の粗酵素液を煮沸した溶液を反応させたものでは検出されなかったことからpSPB1642から発現されるGTによって生じた生成物と考えられる。さらに<sup>1</sup>H NMR分析によって本生成物の構造を調べた。分析にはJNM-EX400 (JEOL) を用い、その他の分析条件は論文 (Plant Physiology 132, 1652 (2003)) に記載のとおりである。この結果、pSPB1642の発現産物によって生じたTHC配糖化物はTHC 2'配糖体であることが明らかとなった。よって、pSPB1642によって発現されるcDNA、つまりpSPB1617 cDNAは2' CGT活性を有するタンパク質をコードしていると考えられた。

#### 【0057】

##### 実施例4. 4' CGT遺伝子のスクリーニング2

黄色キンギョソウ花弁のcDNAライブラリー約30万クローンをpSPB1617 cDNA全長をプローブとして再度スクリーニングした。PCRによるプローブラベリングには、1617-F (配列番号: 26) ならびに1617-R (配列番号: 27) プライマーを用い、実施例2記載の方法と同様に行った。スクリーニングと塩基配列の解析方法も実施例2と同様である。

#### 【0058】

1617-F

配列番号26 : 5' -ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA ACA-3'

1617-R

配列番号27 : 5' -TAA AAT TTG GTA GTT AAA CCG ATG TA-3'

その結果、新規GT遺伝子を5種、pSPB1721、1724、1723、1719、1725を得た。それぞれの配列を配列表に示した (配列番号: 28~31及び1)。

#### 【0059】

このうちpSPB1725 cDNAは、457アミノ酸からなる分子量50.8kDa、pI6.82のタンパク質をコードする1374bp (ストップコドンを除く) のORFを含んでいた。pSPB1725 cDNAがコードするアミノ酸配列 (配列番号: 2) を、すでに報告のあるGTのアミノ酸配列と比較したところリビングストーンデータ由来GT (Plant J. 19, 509 (1999)) と14%、シソ由来GTと18%、シソ由来GTと18%、リンドウの3' GTと23%、プローブとして用いたpSPB1617にコードされるタンパク質のアミノ酸配列とは31%の同一性しか示さなかつた。なお、ホモロジー解析に使用したソフトウェアはMacVector ver. 6.5.3 (Oxford Molecular) に含まれるClustalWで、条件は、Matrix Blosum 30、ketuple:1、Gap penalty:3、Topdiagonals:5、Windows Size:5で行った。

#### 【0060】

##### 実施例5. 得られたcDNAの大腸菌における発現

###### 5-1. 発現ベクターの構築

実施例4で得られた5種類のcDNAについて、大腸菌発現系を用い各cDNAにコードされるタンパク質の酵素活性の測定を調べた。発現ベクターの構築ならびに発現方法、活性測定方法は実施例3と同様である。例えばpSPB1725については、開始コドンの5'側にNcoI認識配列を導入するために、以下に示すプライマー2種1725-NcoI (配列番号: 32)、1725-KpnI (配列番号: 33) を用いてPCR反応を行った。

#### 【0061】

1725-NcoI

配列番号32 : 5' -CCC ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA-3'

1725-KpnI

配列番号33 : 5' -GGT ACC TAT AAA ATT TGG TAG TTA AA-3'

PCR反応液 (25 μl) は、pSPB1725 DNA 10ng, 1x ExTaq buffer (Takara), 0.2mM dNTPs, 1725-NcoI、1725-KpnIプライマー各0.2 pmol/μl, ExTaq polymerase 1.25 Uからなる

。 【0062】

反応は、94℃で5分反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を28サイクル行い、最後に72℃で7分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOPO vector (INVITROGEN)に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。增幅産物の塩基配列を確認したのち、NcoIおよびKpnI処理によってpCR2.1 TOPO vectorから切り出される約1.4Kbのフラグメントを pQE61 (QIAGEN) のNcoIとKpnIサイトに連結し、大腸菌発現ベクター p SPB1768を得た。これを大腸菌 JM109 株(TOYOB0)に導入した。他の4種類の c DNAについても同様にしてそれぞれpQE61を用いた大腸菌発現ベクターを構築し、JM109に導入した。

【0063】

5-2組換えタンパク質の大腸菌における発現と活性測定GT活性の測定

実施例5-1で得られた大腸菌形質転換株を、実施例3と同様の条件で培養し、それぞれのcDNAにコードされるタンパク質の活性測定を行った。その結果、p SPB1768を含む大腸菌の粗酵素液とTHCの反応物中に、THC配糖化物と思われるピークを検出した。このTHC配糖化物をさらに詳しく同定するために、以下に記載のTHC<sup>2'</sup>配糖体とTHC<sup>4'</sup>配糖体を分離する条件にて再度HPLC分析を行った。

【0064】

カラムはYMC-ODS-A312(6mm φ x150mm、株式会社ワイエムシー)を用いて、移動相にはA液として2%酢酸を含むH<sub>2</sub>O、B液としてメタノールを用い、B液15%からB液40%の直線濃度勾配15分間の溶出後、B液40%で5分間維持し、さらにB液40%からB液62%の直線濃度勾配10分間の溶出の後、B液62%で2分間維持した。流速は1.0 ml/min. で行った。検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A (島津製作所) による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。

【0065】

この条件で、THCは保持時間26.7分に溶出され、THC<sup>2'</sup>配糖体は19.8分、THC<sup>4'</sup>配糖体は20.6分に溶出される。pSPB1768を発現する大腸菌抽出液とTHCの反応液中に見出されたTHC配糖化物は本条件による分析で20.6分に溶出されたのでTHC<sup>4'</sup>配糖体であると考えられた。これはpQE61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことから p SPB1725にコードされるGTによって生じた産物と考えられる。以上の結果から、p SPB1725 c DNAにコードされるGTはTHCの4'位の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認された。

【0066】

また、本反応液中にはTHC<sup>4'</sup>配糖体に加えて15.5分に溶出される新たなピークが検出された。この物質はナリンゲニンの吸収スペクトルを示し、ナリンゲニン7位配糖体標品と保持時間が一致した。よってこの15.5分に溶出された生成物はpSPB1725にコードされる4' CGTによって生成したTHC<sup>4'</sup>配糖化物が、配糖化後に閉環して生じたナリンゲニン7位配糖体あるいはTHCが閉環して生じたナリンゲニンに、4' CGTが作用して生じたナリンゲニン7位配糖体と考えられる。

【0067】

実施例6. キンギョソウ花弁における4' CGT遺伝子の発現解析

RT-PCR法によってpSPB1725にコードされる4' CGT遺伝子の黄色キンギョソウ花弁における発現様式を解析した。オーロンを蓄積する黄色キンギョソウ (バタフライイエロー品種) の花弁を成長段階に沿って5ステージに分離した。若い順に、ステージ1(蕾花弁長1cm以下), 2(蕾か弁長1.0-1.5cm), 3(蕾花弁長1.5-2.0cm), 4(花弁長2.0-2.5cm、開花直前) および5(花弁長2.5cm以上、開花後の花弁)の5段階とし、ステージ5は成熟した花弁に対応する。

【0068】

分離した花弁から1g からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。得られたRNA 1μgを鑄型として逆転写反応を行い、cDNAを得た。c DNA合成にはSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(GIBCO BRL)を利用し、合成条件は本シス

テム製造業者が推奨する条件に従った。得られたステージ別のcDNAを鋳型に、実施例5に記載の1725-NcoI（配列番号：32）および1725-KpnIプライマー（配列番号：33）を用いてPCR反応を行った。また、4' CGT遺伝子発現量と内在遺伝子発現量とを比較するために、内部標準遺伝子としてキンギョソウのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子（配列番号：34）を用い（Nature 339, 46 (1989)）、本遺伝子増幅のためにAmGAPDH-F（配列番号：35）、AmGAPDH-R（配列番号：36）のプライマーを合成した。また、比較対象遺伝子としてキンギョソウのAS遺伝子増幅のためにAmAS-F（配列番号：37）、AmAS-Rプライマー（配列番号：38）を合成した。

### 【0069】

AmGAPDH-F

配列番号35: 5' -tgt tgc tgt taa cga tcc at-3'

AmGAPDH-R

配列番号36: 5' -agc tct tcc acc tct cca-3'

AmAS-F

配列番号37: 5' -atg ttc aaa aat cct aat atc cgc-3'

AmAS-R

配列番号38: 5' -tta gcc atc aag ctc aat ctt gac a-3'

### 【0070】

PCR反応条件は実施例3と同様の反応組成で、94°C、1分、55°C、1分、72°C、2分を12サイクル行った。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分離した後、常法によってHybond-Nナイロンメンブレン(アマシャム)にプロッティングし、ハイブリダイゼーションによる増幅産物の検出を行った。ハイブリダイゼーション方法については前述のノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システムDIG-DNA標識及び検出キットを用い、製造者の推奨する方法に従った。プローブには、キンギョソウのAS、GAPDHおよびpSPB1725にコードされる4' CGTのcDNAを用い、実施例2同様にして、上記の各遺伝子特異的プライマー（配列番号32, 33, 35～38）を用いてDIGラベリングを行った。

### 【0071】

その結果、4' CGT遺伝子及びAS遺伝子はともにステージ4で発現がピークに達し、経時に同様の発現パターンを示すことが分かった。さらに両遺伝子の発現パターンは黄色キンギョソウ花弁に含まれるカルコン4' 配糖体およびオーロンの蓄積パターンに矛盾しないと考えられた（Plant Sci. 160, 229 (2001)）。

以上の結果からpSPB1725にコードされる4' CGT遺伝子は、キンギョソウ花弁内においてオーロン合成酵素遺伝子と同一の発現制御支配下に存在することが考えられ、両者は同一の生合成経路、すなわちオーロン生合成経路に関わっていると考えられる。

### 【0072】

#### 実施例7 植物における4' CGTとASの共発現

##### 7-1 4' CGT発現カセットの構築

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37, 45 (1996)) をSnaBIで消化し、再連結することによりomega配列を除き、得られたプラスミドをpUE6とした。一方、pUCAP (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995) をAsclIで消化し、平滑末端化後、PacIリーンカーを挿入したプラスミドをpUCPPとした。pUE6のE1<sub>2</sub>35SプロモーターからNOSターミネーターまでを有する断片を、pUCPPのHindIIIとEcoRIサイトに挿入しpSPB540を得た。pSPB540のGUS遺伝子部分をpSPB1725から切り出される4' CGT cDNA断片に置換し得られたプラスミドをpSFL203とした。すなわち、pSFL203はpUCPPをベクターとし、E1<sub>2</sub>35SプロモーターとNOSターミネーターで制御される4' CGT発現カセットを有するものである。

### 【0073】

##### 7-2 AS発現カセットの構築

キンギョソウ由来のAS cDNA (Science 290, 1163, (2000)) がpBluescript II SK-ベクター(Stratagene)のEcoRIとXhoIサイトに挿入したプラスミドをpSPB251とした。pBINPLUS (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995) にMacIプロモータ

一、pSPB251から切り出したAS cDNA断片、MASターミネーターを連結したAS発現コンストラクトをpSPB1624とした。

#### 【0074】

##### 7-3 4' CGTとASの共発現コンストラクトの作製

7-1に記載のpSFL203をPacIで切断し、カルコン配糖化酵素遺伝子発現カセットを切り出し、これを7-2記載のpSPB1624のPacIサイトに挿入した。得られたコンストラクトをpSFL201とした。よってpSFL201は植物細胞に導入された場合、4' CGT遺伝子とAS遺伝子が構成的に発現するように設計されている。

#### 【0075】

##### 実施例8 植物における4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFRの抑制

###### 8-1 トレニア由来のDFR遺伝子発現抑制カセットの構築

トレニアのジヒドロフラボノール還元酵素 (DFR) cDNAについて論文(Plant Science 153, 33, 2000)に記載のようにして取得した。トレニアDFR cDNAがベクターpBluescriptII SK-と連結したプラスミドをpTDF10とした。これを鑄型とし、ベクター配列に由来するM13リバースプライマー(配列番号39)とトレニアDFR cDNA配列に塩基置換でNcoI認識部位を導入したプライマーThDFR-NcoI(配列番号40)を用いて、実施例3に記載のようにしてPCRを行った。得られた約0.75kbのフラグメントをpCR2.1-TOPO(インビトロジェン)にクローニングし、塩基配列を確認したのち、SacIとNcoIで0.75kbのトレニアDFR cDNA配列を切り出した。

#### 【0076】

またpTDF10をBamHIとNcoIで切断し、トレニアDFR cDNAの5'末端から1.1kbを含むフラグメントを回収した。一方、7-1記載のpUCAPをPacIで消化し、平滑末端化後、AscIリinkerを挿入したプラスミドをpUCAAとした。このpUCAAのHindIIIとEcoRIサイトに、pUE6から切り出したE1<sub>2</sub>35Sプロモーター～GUS～NOSターミネーターに至るフラグメントを挿入し、得られたプラスミドをpSPB541とした。pSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここに、トレニアDFR cDNA由来の0.75kbのフラグメントとおよび1.1kbのフラグメントを、両フラグメントのNcoI部位が連結する方向に挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL314は、植物体内の導入された場合、E1<sub>2</sub>35Sプロモーターの制御下、トレニアのDFR cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのDFR遺伝子発現を抑制することができるものである。

#### 【0077】

M13リバースプライマー

配列番号39： 5' -AACAGCTATGACCATG-3'

ThDFR-NcoI

配列番号40： 5' -GCTTTACCATGGAGTAATGAGCTT-3'

#### 【0078】

##### 8-2 4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFRの抑制のためのコンストラクトの構築

7-1記載のpUE6のNOSターミネーター上流にXhoIリinkerを挿入した。このプラスミドをBamHIとXhoIで消化して得られるE1<sub>2</sub>35Sプロモーター～ベクター～NOSターミネーターからなる断片と7-2記載のpSPB215からBamHIとXhoIで切り出したAS cDNA断片を連結しpSPB211を得た。pSPB211からHindIIIとEcoRIでAS発現カセットを切り出し、これをpBINPLUSのHindIIIとEcoRIサイトに挿入した。このようにして得られたプラスミドのPacIサイトに、7-1記載のpSFL203をPacI切断して得られる4' CGT発現カセットを挿入し、4' CGTとASの発現カセットがタンデムに連結したpSFL304を得た。さらに8-1記載のトレニアDFR 二本鎖RNA転写カセットをpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL307を得た。つまりpSFL307は4' CGTとASの発現ならびにトレニアのDFR抑制のための3つのカセットを有する。

#### 【0079】

##### 実施例9 植物における4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3Hの抑制

###### 9-1 トレニア由来のF3H cDNAのクローニングと同遺伝子発現抑制カセットの構築

シソから得られたF3H cDNA (Plant Mol Biol., 35, 915 (1997)) をプローブとして、

トレニアの同酵素をコードするcDNAを取得した。すなわち、実施例2同様にして、トレニアcDNAライブラリー（Molecular Breeding, 6, 239, 2000）約20万のファージをスクリーニングした結果、配列番号41に示すトレニアF3H cDNAを得た。トレニアF3H cDNAがベクターpBluescriptII SK-と連結したプラスミドをpSPB266とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来するM13リバースプライマー（配列番号39）とトレニアF3H cDNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H-SalI-1（配列番号42）を用いて、実施例3同様にしてPCRを行った。

#### 【0080】

得られた約0.9kbのフラグメントをpCR2.1-TOPO（インビトロジェン）にクローニングし、塩基配列を確認した。同様にして、トレニアF3H cDNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H-SalI-2（配列番号43）とM13リバースプライマーを用いて、約0.75kbのDNA断片を調整し、pCR2.1-TOPOにクローニングし、塩基配列を確認した。実施例8-1に記載のpSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここにpCR2.1-TOPOからBamHIとSalI切断で切り出した0.9kbのフラグメントと、pCR2.1-TOPOからSacIとSalI切断で切り出した0.7kbのフラグメントを両フラグメントのSalI部位が連結するように挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL313は、植物体内に導入された場合、E1235 Sプロモーターの制御下、トレニアのF3H cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのF3H遺伝子発現を抑制するものである。

#### 【0081】

ThF3H-SalI-1

配列番号42： 5' -ttctctgtcgacgcccattgcc-3'

ThF3H-SalI-2

配列番号43： 5' -cgccgtgtcgactcgcttgaag-3'

#### 【0082】

##### 9-2 4' CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3Hの抑制のためのコンストラクトの構築

9-1記載のpSFL313からAscI切断によりトレニアF3H RNAi抑制カセットを切り出し、実施例8-2記載のpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL308を得た。つまりpSFL308は4' CGTとASの発現ならびにトレニアのF3H抑制のための3つのカセットを有する。

#### 【0083】

##### 実施例10. 植物における遺伝子発現と花色分析

実施例7-9で述べたpSFL201、pSFL307およびpSFL308を公知の方法でトレニア（品種サマーウェーブブルー（サントリーフラワーズ株式会社））に導入した。形質転換の方法はMol. Breeding, 6, 239, (2000)に記載の方法にしたがった。選択マーカー耐性を示した個体を選抜し、それぞれの花色を観察した。pSFL201導入株では、得られた35系統の形質転換体のうち、22系統において宿主と比べて花色変化が見られ、黄色味を帯びた青、もしくは黄色味を帯びたグレーを示した。

#### 【0084】

しかし、完全に黄色になったものはなかった。pSFL307導入株では得られた36系統の形質転換体のうち、19系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した19系統のうち6系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。またpSFL308導入株では得られた39系統の形質転換体のうち、24系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した24系統のうち17系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。

#### 【0085】

花色変化が比較的顕著であったものについて色素分析を行った。

元株および各形質転換体の花弁を0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）を含む50%アセトニトリルに浸潤し、フラボノイドを抽出後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によりオレオシジン6位配糖化物およびアントシアニジンの分析を行った。アントシアニジン分析については花弁より抽出したフラボノイドを6NHC1にて沸騰水中、20分間で加水分解後、アミルアルコールにてフラボノイドを再抽出したものを分析に供した。HPLC条件はそれぞ

れ以下のとおりである。

#### 【0086】

まずAU6位配糖化物の検出には、SHIM-PACK FC-ODSカラム(50×4.6mm、島津製作所)を用い、移動相にはA液として0.05%TFAを含むH<sub>2</sub>O、B液として0.05%TFAを含むアセトニトリルを用いた。B液10%から23%の直線濃度勾配3分間の溶出後、B液23%で17分間維持し、さらにB液23%から80%の直線濃度勾配2分間の溶出後、B液80%で3分間維持した。さらにB液80%から10%の直線濃度勾配2分間で溶出した。流速は0.8ml/minで行った。検出は360、400nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP(島津製作所)による250-500nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、THC 4'位配糖化物、AU 6位配糖化物標品はそれぞれ保持時間14.17分および6.19分に溶出される。

#### 【0087】

次にアントシアニジンはカラムはYMC-ODS-A A312(6×150mm、株式会社ワイエムシー)を用いた。移動相には酢酸、メタノール、蒸溜水をそれぞれ60:70:270に混合したものを使い、11分間維持した。検出は520nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP(島津製作所)による400-600nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、マルビジンは保持時間9.12分に溶出される。

#### 【0088】

その結果、pSFL201を導入した形質転換体ではTHC 4'位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物と保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、それぞれ花弁中に0.02%および0.05%(花弁新鮮重量中のW/W)生成していることが確認された。また宿主が本来含有するアントシアニジン類も形質転換体に存在するため、これら形質転換体で観察された黄色がかった青またはグレーの花色は、THC 4'位配糖化物ならびAU 6位配糖化物と、マルビジンなどのアントシアニジン類が共存したためと考えられる。

#### 【0089】

一方、pSFL307および308を導入した形質転換体ではオーロンの一種であるAU6位配糖化物のみと保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、ともに花弁中に0.09% (花弁新鮮重量中のW/W)生成していることが確認された。またpSFL201を導入した系統とは異なり、pSFL307またはpSFL308が導入された系統では、宿主が本来有するアントシアニジン類が宿主花弁に含まれる当該アントシアニジンの10~50%と著しく減少していることが確認された。

#### 【0090】

##### 実施例11. ゲノミックサザンハイブリダイゼーションによる4' CGT遺伝子導入の確認

実施例10で得られた形質転換体のうち、花弁の色素分析結果からTHC 4'位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物の蓄積量が比較的多かった系統を、各コンストラクト導入株から3系統ずつ選抜し、ゲノミックハイブリダイゼーションをおこなった。形質転換体の葉、約1gからPhytopure Plant DNA Extraction kit(Amersham)を用い、製造業者推奨の方法によってゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNA各20μgを制限酵素KpnIで切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動にて分離後、常法にしたがってHybond-N<sup>+</sup>ナイロンメンブレンに転写後、ノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システムを用い、ハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0091】

4' CGTプローブのDIGラベリング、ハイブリダイゼーションならびに検出方法は実施例6同様に製造業者推奨の方法に従った。ハイブリダイゼーションの結果を図2に示す。pSFL201、pSFL307、pSFL308の制限酵素地図を考慮するとゲノミックサザンで検出されたバンドの数から各形質転換体に導入された4' CGT遺伝子コピー数を推定することができる。

pSFL201導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される。pSFL307導入系統については、系統番号2および4の個体は1コピー、系統番号13の個体では2本のバンドが見られることから2コピーの4' CGT cDNAが導入されたものと考えられる。pSFL308導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される

## 【0092】

実施例12 定量RT-PCRによる導入遺伝子の発現解析

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて元株および形質転換体各系統のつぼみから total RNA を抽出し、得られたtotal RNA  $1\mu\text{g}$ より Super Script<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。得られたcDNAのうち $1\mu\text{l}$ をテンプレートとし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) にてトレニアDFR, F3Hおよび外来性遺伝子であるAS, 4' CGTの転写産物の発現定量を行った。製造者が推奨するソフトウェア' Primer Express' にて、各遺伝子を特異的に増幅するようなオリゴプライマーおよび特異的にハイブリダイズするような両末端を蛍光ラベルしたTaq Man プローブを設計し反応に供した。また内在性コントロールとして、トレニアのグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を用いた。

## 【0093】

反応液は、元株または形質転換体各系統のcDNA， 1x Taq Man Universal Master Mix (Applied Biosystems), オリゴプライマー 各 $100\text{nM}$ , Taq Manプローブ  $100\text{nM}$ からなる 総体積 $50\mu\text{l}$ に調整した。反応条件は、 $50^\circ\text{C}$ で2分、 $95^\circ\text{C}$ 、10分反応させた後、 $95^\circ\text{C}$ 、15秒、 $60^\circ\text{C}$ 、1分の反応を40サイクル行いPCRでの増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出した。その結果、pSFL201導入系統では導入したAS, 4' CGTがともに高発現していることを確認した。pSFL307導入系統では導入したAS, 4' CGTがともに発現し、内在性のDFRmRNAが元株に比べて約10%程度にまで抑制されていることが確認された。また、pSFL308導入系統においては導入したAS, 4' CGTがともに発現し、内在性のF3HmRNAが元株に比べて約5%程度にまで抑制されていることが確認された。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0094】

【図1】植物における典型的なフラボノイド合成経路を示す。ここに記載された酵素遺伝子の有無により植物種ごとに代謝経路の末節は異なる。たとえば、黄色のキンギョソウ花弁においてはアントシアニン合成経路と共にオーロン合成に至る経路も存在するが、同じゴマノハグサ科の植物であっても、トレニアでは4' CGT、AS遺伝子が存在しないため、オーロンを合成することは出来ない。図中の略称については以下参照。  
CHS, カルコン合成酵素; CHI, カルコン異性化酵素; F3H, フラバノン 3-水酸化酵素; DFR, ジヒドロフラボノール4-還元酵素; ANS, アントシアニジン合成酵素; 3GT, UDP-グルコース:アントシアニジン 3-糖転移酵素; FLSフラボノール合成酵素; FNS, フラボン合成酵素; F3'H, フラボノイド 3'-水酸化酵素; F3', 5'H, フラボノイド 3', 5' -水酸化酵素; 2' CGT, UDP-グルコース:4, 2', 4', 6' -テトラヒドロキシカルコン 2' -糖転移酵素; 4' CGT, UDP-グルコース: 4, 2', 4', 6' -テトラヒドロキシカルコン 4' -糖転移酵素; AS, オーレオシジン合成酵素

## 【図2】図2は、図1の続きである。

【図3】図3は、形質転換体トレニアのサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。pSFL201、pSFL307、pSFL308導入の形質転換体トレニア(品種サマーウェーブブルー)葉よりゲノムDNAを抽出し、KpnI切断後、4' CGTをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションに供した。各レーンの上の数字は導入遺伝子コンストラクトおよび形質転換体系統番号を記す。SWBは宿主サマーウェーブブルーである。M1、M2はDIGラベルしたサイズマーカーであり、各バンドのサイズを図の左右に記す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110>Suntory Limited te al.  
<120>Process for production of yellow flowers by control of flavonoid synthesis system  
<130>1034724  
<160>43  
<210>1  
<211>1422  
<212>DNA  
<213>  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>Nucleic acid in pSPB1725  
<400>1

atg gga gaa gaa tac aag aaa aca cac aca ata gtc ttt cac act tca	48
Met Gly Glu Glu Tyr Lys Lys Thr His Thr Ile Val Phe His Thr Ser	
1                  5                  10                  15	
gaa gaa cac ctc aac tct tca ata gcc ctt gca aag ttc ata acc aaa	96
Glu Glu His Leu Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Thr Lys	
20                25                30	
cac cac tct tca atc tcc atc act atc agc act gcc ccc gcc gaa	144
His His Ser Ser Ile Ser Ile Thr Ile Ile Ser Thr Ala Pro Ala Glu	
35                40                45	
tct tct gaa gtg gcc aaa att att aat aat ccg tca ata act tac cgc	192
Ser Ser Glu Val Ala Lys Ile Ile Asn Asn Pro Ser Ile Thr Tyr Arg	
50                55                60	
ggc ctc acc gcg gta gcg ctc cct gaa aat ctc acc agt aac att aat	240
Gly Leu Thr Ala Val Ala Leu Pro Glu Asn Leu Thr Ser Asn Ile Asn	
65                70                75                80	
aaa aac ccc gtc gaa ctt ttc gaa atc cct cgt cta caa aac gcc	288
Lys Asn Pro Val Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg Leu Gln Asn Ala	
85                90                95	
aac ctt cga gag gct tta cta gat att tcg cga aaa tcc gat atc aaa	336
Asn Leu Arg Glu Ala Leu Leu Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asp Ile Lys	
100              105              110	
gca tta atc atc gat ttc ttc tgc aat gcg gca ttt gaa gta tcc acc	384
Ala Leu Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe Glu Val Ser Thr	
115              120              125	
agc atg aac ata ccc act tac ttc gac gtc agt ggc ggc gct ttt ctc	432
Ser Met Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Val Ser Gly Gly Ala Phe Leu	
130              135              140	
ctc tgc acg ttt ctc cac cac ccg aca cta cac caa act gtt cgt gga	480
Leu Cys Thr Phe Leu His His Pro Thr Leu His Gln Thr Val Arg Gly	
145              150              155              160	
gac att gcg gat ttg aac gat tct gtt gag atg ccc ggg ttc cca ttg	528
Asp Ile Ala Asp Leu Asn Asp Ser Val Glu Met Pro Gly Phe Pro Leu	
165              170              175	
att cac tcc tct gat tta cca atg agt ttg ttt tat cgt aag act aat	576

Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Met Ser Leu Phe Tyr Arg Lys Thr Asn			
180	185	190	
gtt tac aaa cac ttt cta gac act tcc tta aac atg cgc aaa tcg agt			624
Val Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ser Leu Asn Met Arg Lys Ser Ser			
195	200	205	
ggg ata ctc gtg aac acg ttt gtt gcg ctc gag ttt cga gct aag gaa			672
Gly Ile Leu Val Asn Thr Phe Val Ala Leu Glu Phe Arg Ala Lys Glu			
210	215	220	
gct ttg tcc aac ggt ttg tac ggt cca act ccg cct ctt tat tta ctt			720
Ala Leu Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Pro Thr Pro Pro Leu Tyr Leu Leu			
225	230	235	240
tca cat aca att gcc gaa ccc cac gac act aaa gtg ttg gta aac caa			768
Ser His Thr Ile Ala Glu Pro His Asp Thr Lys Val Leu Val Asn Gln			
245	250	255	
cac gaa tgc cta tca tgg ctt gat ttg cag cct agt aaa agc gtg att			816
His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Leu Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile			
260	265	270	
ttc ctt tgt ttc gga aga aga gga gcg ttc tca gca caa cag ttg aaa			864
Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Ala Phe Ser Ala Gln Gln Leu Lys			
275	280	285	
gaa att gcg ata ggg ttg gag aag agt gga tgt cga ttt ctt tgg ttg			912
Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Lys Ser Gly Cys Arg Phe Leu Trp Leu			
290	295	300	
gcc cgc att tca ccg gag atg gac tta aat gcg ctt ctg ccg gag ggt			960
Ala Arg Ile Ser Pro Glu Met Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Glu Gly			
305	310	315	320
ttt cta tcg aga act aaa gga gta ggg ttt gtg aca aac aca tgg gtg			1008
Phe Leu Ser Arg Thr Lys Gly Val Gly Phe Val Thr Asn Thr Trp Val			
325	330	335	
ccg caa aaa gag gtg ttg agt cat gat gca gtg ggg ggg ttt gtg act			1056
Pro Gln Lys Glu Val Leu Ser His Asp Ala Val Gly Gly Phe Val Thr			
340	345	350	
cat tgc ggg tgg agt tcg gtt ctt gaa gcg ctg tcg ttc ggt gtc ccg			1104
His Cys Gly Trp Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Phe Gly Val Pro			
355	360	365	
atg att ggt tgg ccg ttg tac gca gag cag agg atc aat agg gtg ttc			1152
Met Ile Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Ile Asn Arg Val Phe			
370	375	380	
atg gtg gag gaa ata aag gtg gcg ctg cca ttg gat gag gaa gat gga			1200
Met Val Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Asp Glu Glu Asp Gly			
385	390	395	400
ttt gtg acg gcg atg gag ttg gag aag cgc gtc agg gag ttg atg gag			1248
Phe Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu			
405	410	415	
tcg gta aag ggg aaa gaa gtg aag cgc cgt gtg gcg gaa ttg aaa atc			1296
Ser Val Lys Gly Lys Glu Val Lys Arg Arg Val Ala Glu Leu Lys Ile			
420	425	430	
tct aca aag gca gcc gtg agt aaa ggt gga tcg tcc ttg gct tct ttg			1344
Ser Thr Lys Ala Ala Val Ser Lys Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Leu			
435	440	445	

gag aag ttc atc aac tcg gtc act cgt taaag tttcttactc aatatatggt 1396  
 Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg  
 450 455  
 acatcggtt aactaccaaa ttttat 1422

<210>2  
 <211>457  
 <212>PRT  
 <213>  
 <223>Amino acid sequence of 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcane 4'-0-glycosyltransfe-  
 rase encoded in pSPB1725  
 <400>2  
 Met Gly Glu Glu Tyr Lys Thr His Thr Ile Val Phe His Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu His Leu Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Thr Lys  
 20 25 30  
 His His Ser Ser Ile Ser Ile Thr Ile Ile Ser Thr Ala Pro Ala Glu  
 35 40 45  
 Ser Ser Glu Val Ala Lys Ile Ile Asn Asn Pro Ser Ile Thr Tyr Arg  
 50 55 60  
 Gly Leu Thr Ala Val Ala Leu Pro Glu Asn Leu Thr Ser Asn Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Lys Asn Pro Val Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg Leu Gln Asn Ala  
 85 90 95  
 Asn Leu Arg Glu Ala Leu Leu Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asp Ile Lys  
 100 105 110  
 Ala Leu Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe Glu Val Ser Thr  
 115 120 125  
 Ser Met Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Val Ser Gly Gly Ala Phe Leu  
 130 135 140  
 Leu Cys Thr Phe Leu His His Pro Thr Leu His Gln Thr Val Arg Gly  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Ala Asp Leu Asn Asp Ser Val Glu Met Pro Gly Phe Pro Leu  
 165 170 175  
 Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Met Ser Leu Phe Tyr Arg Lys Thr Asn  
 180 185 190  
 Val Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ser Leu Asn Met Arg Lys Ser Ser  
 195 200 205  
 Gly Ile Leu Val Asn Thr Phe Val Ala Leu Glu Phe Arg Ala Lys Glu  
 210 215 220  
 Ala Leu Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Pro Thr Pro Pro Leu Tyr Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Ser His Thr Ile Ala Glu Pro His Asp Thr Lys Val Leu Val Asn Gln  
 245 250 255  
 His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Leu Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile  
 260 265 270  
 Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Ala Phe Ser Ala Gln Gln Leu Lys  
 275 280 285  
 Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Lys Ser Gly Cys Arg Phe Leu Trp Leu  
 290 295 300

Ala Arg Ile Ser Pro Glu Met Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Glu Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Ser Arg Thr Lys Gly Val Gly Phe Val Thr Asn Thr Trp Val  
 325 330 335  
 Pro Gln Lys Glu Val Leu Ser His Asp Ala Val Gly Gly Phe Val Thr  
 340 345 350  
 His Cys Gly Trp Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Phe Gly Val Pro  
 355 360 365  
 Met Ile Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Ile Asn Arg Val Phe  
 370 375 380  
 Met Val Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Asp Glu Glu Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Phe Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu  
 405 410 415  
 Ser Val Lys Gly Lys Glu Val Lys Arg Arg Val Ala Glu Leu Lys Ile  
 420 425 430  
 Ser Thr Lys Ala Ala Val Ser Lys Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Leu  
 435 440 445  
 Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg  
 450 455

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;21

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT

&lt;400&gt;3

gaaatggtcg gattggctgg g

21

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;21

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT

&lt;400&gt;4

acctccaccc caactttcag g

21

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;24

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT  
 <400>5

gatgcataat ttggctagaa aagc

24

<210>6

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT

<400>6

ccaatttgcc aaacactttc c

21

<210>7

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT

<400>7

tgcctcgaaat ggttgagcac g

21

<210>8

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT

<400>8

ctctcactct cacacccg

18

<210>9

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT

<400>9

cacgaatgct tagcatggct c

21

<210>10

<211>21

<212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT  
 <400>10  
 cttattgccctactgaaaccc c 21

<210>11  
 <211>21  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT  
 <400>11  
 tgtctgaatt ggcttggattc c 21

<210>12  
 <211>21  
 <212>DNA  
 <213>Artificial Sequence  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT  
 <400>12  
 aaccacacaga aaccctgtt c 21

<210>13  
 <211>1446  
 <212>DNA  
 <213>  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>pSPB264  
 <400>13  
 atggaaaaac ttcacattgc cttattcca gttatggctc atggcacat gatccaaatg 60  
 ttggacatgg ccaagcttt tacctaaga ggcatacaaa caacaatcat ttcgactctc 120  
 gccttcgtg atccgataaaa caaagctcgat gattcgggccc tcgatattgg actaaggcatc 180  
 ctcaaattcc caccagaagg atcaggaata ccagatcaca tggtgagccct tgatcttagtt 240  
 actgaagatt ggctccaaa gtttggtag tcattagtct tattacaaga gccagtttag 300  
 aagcttatcg aagaactaaa gctcgactgt ctcgtttccg acatgttctt gccttggaca 360  
 gtcgattgtg cggttaagt cggattccg aggttggttt tccacggAAC gagcaacttt 420  
 gcgttgtgtg cttcggagca aatgaagctt cacaaggcatt ataagaatgt aacttctgat 480  
 actgagacat ttgttatacc ggatttcccg catgagctga agtttggtag gactcaagtg 540  
 gctccgttcc agcttgcggaa aacggagaat ggattctcaa agttgatgaa acagatgacg 600

<210>14

<211>1488

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>pSPB662

<400>14

atggcccttc aaattcaacc agagcgttca aacttcgttt tcataccatt catggcccct  
ggccactcaa tccctatgtat agacttagcc aaattattcg cggaacgcgg cgtcaacgtaa  
acgatcatcg taacacccct taacgccgca cgattcaatt ccgttattaa tcgagccgtt  
gaatcaggac agtccattcg tcttccttccaa gtaaaaattcc ctggtaaga agccgggttg  
ccacctggat gcgaaagcgc cgagacttta ccatctttag aattgattcc aaatttttt  
accgcccgtaa aaatgttaca acaaccaatc gaggaagaat tgagaaattt gatccctta  
ccaagctgct tcatttgta taaacacata ccctggactg ctcaaacgtg caagaatctc  
cgaattccga ggataatttt cgatggaatg agctgttttgc tcctttagt aacacacgtt  
ctctacgtgt ctaaggttca tgaaaccgtt cctccaaacg agccgttcgt tggtctgt  
ttccccgatg agatagagtta aacgagggtt caattgccag ggttgttgc tccaagtccaa  
aggataaatt ttacgattt tcgcgaacaa gtgaagaaaa ctgaggagga ggcttatggg  
gtggtgttgc acagtttgc ggagctggaa aaagattatt tcgagatgtt tcgaaatttgc  
aaagggggta aagtttgggtg tggggcct ttgtcgctt atgtaacga cgatttggac  
agggctggaa gagggataa ggcgtcgatt gatacggatc ggtgtatgaa atggcttgat  
gatatgaaac cagaatctgt aatttgc ttgttggaa gcctgagtgc ttgtcgcgt  
tcacagttcg tcgaacttgc ttgggattt gaagcatcaa aacactcgat ttgtcttagt  
gttaaaaccg aaggagagaa gtcgttggaa atagagaaat ggattttggaa caatggattc  
gaggaaagaa cggaaagatag agggtcttg attcggtt ggtcgccaca agtgttgc  
ttgtcgcatt ttgcagtggg aggattcttgc acgcattgtt gttggattt gacgcttgag  
ggcattttgtt ctgggttgcc aatgggtatg tggccgtatgt tcggcgaaca gttttgaat  
gagaagtttag tgggtcagat ttggggacg ggtgtggag ttggagcgaa aagtacggta  
catttggggg atgaagagat ggttgcgttgc agatgcgaa ggaagggat taccaaggcg  
gtcggtggcag ttatggatag aggaactgaa ggtgtgtgaga ggccggagaaa ggcgaaggag  
cttgggtgaaa tggctaagag ggcagtccaa gttggggat cttcatgtaa gaatgtcgcac  
cagctaattc aagaagtgc accattgagt gtacgcaggat atgtgtaa

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt;1446

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1621

&lt;400&gt;15

atgggttctc	tccctgaaaa	tgagctcaac	aaaccacatg	ctgtgtcat	accatatcca	60
gcactaggc	atttcagtcc	catgcttagat	tttgctaagc	tcctccacca	aaaaggcitt	120
cacataacct	tcgtcaacac	cgagtacatc	cgtctccgccc	tcctcaagtc	ctgtggccct	180
gccgcctgg	acgggctacc	ggactttcgc	ttcatgacta	tccccatgg	cctcccttg	240
tcggacgacg	tttcgcgtga	tgtcgctcc	atttctgtct	ctactaacaa	aacttgctta	300
gaacccttt	gtgaggtgct	atcggacctc	atggataatg	gttccaaccc	gccggtgagc	360
tgcattgtgt	ccgacggggt	aatgagttc	acccttgggg	cggcggagag	gtttggactg	420
ccagagggtgc	tgttctggac	gcccgcgtct	tgtggcatct	tagcttac	gcagtataag	480
catcttgtgg	agagaggata	tgtacctctc	aaagatacga	gccaggtaac	aaatggctac	540
ctggaaacaa	tattagattt	ggttccaggg	atgaaggata	ttcgattgag	ggaattccca	600
actttataaa	gaacgacgga	cccaaacgac	gttatgctgg	attttctaat	aaaacaagtt	660
gacgccaccc	cgaaagccaa	tgctgtgatc	atcaacacgt	tcgacacatt	ggaaagtgac	720
gctctcaacg	ccctctctgt	catgttccg	cgcataataca	cactcgggcc	tctccatatg	780
atgttgaata	atcccgggt	cgacgaaccc	tctaattgcaa	tcaaatttaa	tctttggaaa	840
gaagactcac	attgcctaga	ttggctcgat	gtgaacgagc	ccggatcgt	tgtatacgtg	900
aattttggca	gctcaacaat	tctgactgtt	gaacaactaa	ctgaatttagc	atggggcctt	960
gctaacagca	agaaaaccgtt	cctttggatc	atcaggcctg	attnagtaac	tggtgcatcc	1020
tccatgcttc	cgcctgagtt	cctggcgtcag	actaaagaca	gaagcatgtt	agtgagttgg	1080
tgcaaccaag	aacaagtgtt	gaagcacccc	gcgactggag	tgttcttgac	gcattgtgga	1140
tggaaattcga	cgattgaaag	catttgcagc	ggcgtgccaa	tgatttggat	gccttactac	1200
gctgagcagc	aaaccaactg	taggtacagt	tgtgtggaa	gggaaatagg	aatggagatc	1260
attgacaacg	atgtgaagag	agatgaggtg	gaattgctgg	tgattaagtt	gatggatggt	1320
atcaagggaa	agaaaatgaa	aaagaagct	atggagtgg	agaggaaagc	agaagaggcg	1380
gtagcttttgc	ggggctcttc	ctacatgaat	ttggataaaac	ttattagcga	cgtgctttt	1440
ccataaa						1446

&lt;210&gt;16

&lt;211&gt;1458

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1620

&lt;400&gt;16

atggcaggc	caaattgcaa	gcctcagcc	atcatgatcg	cacttcctta	ccaaggccac	60
ataactccctt	ttgtcaatct	tgcactaaaa	cttgcttcca	atggcttac	aatcacttt	120
gttcacctt	aatttatcca	ccaaatgtt	tctaaagccc	ataacgcccac	taaaactgaa	180
gcagatttat	tttcggaaagc	acgagaatcc	ggtctcgaca	tacgttacac	aacgattgac	240
gatggtttcc	ctttggaaatt	cgacaggcgt	ctccactccg	aggagtattg	gcactccatg	300

ttgcgagatt tcccggttaca cgtcgatgag ttgttcgaa aagtcgtgga gtcagagcca	360
ttttttagagc actttttggc tacggatact atgtatacat ggcctgcaac cattgcaaag	420
aaacataatc ttgtgaatat ttcgtttgg actgaaccag ccctgggttt ttctttgtct	480
taccatataa accttctgaa gcaaaatggt catttccat gtaaaagaaaa tattgtatgg	540
gaaataaaatt acgtaccagg agttgattca ataagtacaa gggatttaat gtcttatttt	600
aaagaaccag gatcagaaac attagagaaa aatgttgatgc tcaaggcatt tgaaggagtg	660
aagaaagctg atttcatctt gcataacaca ttgcaagaac tagaatctga gacactctca	720
gctcttacca aaatgcagcc aaattacgccc gttggaccta ttaatttctc caaacatact	780
cctaaaactg tcaccaagag tctacggctc gaattcgact gcaccaactg gctcgactct	840
aagcctccca actctatttt atacgtctcg tttggtagtt ttattcagac aagcaaagag	900
gtaattgaag aaatcgctt cggcttctc ctttagtgaag ttaactttat atgggtggtt	960
agaacagata gtgtgagttt agaggataac gaggtttgc cggttggatt tagggatgag	1020
gttaaagata ggggggtttagt agttccgtgg tgtgatcaaa ttacggttt gtctaatcgc	1080
gcgggtggag gattcttgac gcattgtgga tggaaactcgg tattagagag tatgtgggt	1140
ggcggtccca tgatttggta tccgttaaca tatgtcaac ctactaatag gaaaactattg	1200
gttgatgatt ggaagattgg cattaatctt tgcgacggag cgttgattaa tagaaaagaa	1260
attgcagaga agattaaggc cttgatgagt gaaagtactt cagaggggtt gagggaaagaa	1320
tctgagaaag ttaagggctt gttgaagaat gcactggaag ttgggtggtc atcagagaag	1380
aatttcaata aatttattga ggatttgaag gcaaaaattc aaataatgaa agagcaaatg	1440
cctgctaata ccagttga	1458

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;1443

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1622

&lt;400&gt;17

atgggttcca cagccgaaaa taaacagaaaa acccacattt tgcataacc ctacccagcc	60
caggggcaca tcagccccat gctaaagttt gccaaactgc tacaccaaaa cggctttac	120
atcacttttgc tcaacacggc gtacaaccac cgccgcctca tcaagtcccg cggcccccacc	180
gccctcgacg gattccccggc ttccgggtt gttacgatcc ccgacgggct tcctttctct	240
gaagccgacg ccacacagga tatcccttct ctttgtttt caaccaccaa cacttgcttgc	300
gagccctttt gcgagctgct gtcgaaccc aataactccg gcccggacgt gccccccgggt	360
agctgcattcg tatccgatgg tgcattggc ttacgatgc aggccggcggag gagatttggg	420
ctgcccggagg tgctgtctg gacgacgatg gcgtgtgggt tcttggcgta tacgcagtt	480
aagcatctcg tggagaaagg ctatgtaccc ctcaaaagata tgagccaaatg aacggatgg	540
tatttggaaaa caagcatggc ctggatcca ggaacgaagg acatccaact aaggacttc	600
ccctcttca tcaggacaac agatccagaa gacatcatgc ttaattttt aatacaagaa	660
actgatgttgc ttccggagagc caaagctgttataatcaaca ctttcgacat gttagaacac	720
gacgtccctgg aaggcgcttc caccatgtt tcacgcgtt acagcatcgg ccctcttcag	780
ctgtatgttgc attatgttca caacgagtcc cttaaatcca tcagttccag tcttatggaaa	840
gaagaaacac attgcgtcga ttggctcgat tcaaaggagc ccgaatccgt tgcgtacgt	900
aattttggca gcataactgt cgtgactgca gaacaactga ctgagttgc gtgggggctc	960
gctaataatgtt agaagacttt cctatgggtt attaggcctg atatagttgc tggagactcg	1020
gctatgctgc cccctgaattt cgtgacggggg acaaaaagata gaagcatgtt aatcagctgg	1080
tgttaaccaag aacagggtttt gaatcacccca tcaattggag gtttttgac gcacagtgg	1140
tggaaattcga cgatttggaaat tatagtcgag ggagttccctg tgatttgcgtt gcctttctt	1200

gctgagcagc aaacaaattt tagttcaagt tgcgtggaaat gggaaatagg aatggagatt	1260
gataataatg tgaagagaga tgaggttcaa gtttttgtga gggaaattttagt ggatggagag	1320
agggggaaaga aatgaagga gaaagctatg gagtgaaag ggaaagcatt agaggcaact	1380
gcacttgggg gcttccta cttgaactt gaaaaactaa ttaaggaggt gctttgcat	1440
taa	1443

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;1407

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1610

&lt;400&gt;18

atggcatctt ctccccataa ccagccaacc acgccccgcc acgtggtgcc cctaccctac	60
cccggcccgcc gccacataaa ccccatgctc aacatctgca aagccgtagc ggagaagagc	120
agccacatca acataacaat catcctaacc gaggaatggc tcggcttaat cggctcagcc	180
gacaagccgc cgaacataag ctacgcccgcg ataccgaaca ttctgcccgc ggagcacgtt	240
cgcggcgagg atccacatgg ttttggcg gctgttggc agaagatgga ggagccgggtt	300
gatcggtcgc tggacgagct tcggcttaat aataacaagc cggagttgt gatagccgat	360
gctttctgc attggcgcc tgacgtggcg ggcaggagga atattccctt ggcacatgtt	420
tggccaatgt cgccgtccac gttcacgggt cttaaccact ttgaccttct cgttgaccac	480
ggacacttc cgatcgacat accagtgaat ggagatgcta ttgtggatta catcccgaaa	540
ctccctccag ttgcgtcgc agatttcca aaagacataa gaaaacaaga agacgcattcc	600
ttcgtcctta aactcattcc caactcacca aaattcatca tcttacttc aatttacgac	660
ctcgaatcca agatcatcga cgctctaaag caaaaatctt ctttctcaat ctacaacatt	720
ggtcctcatg cttcctattc caaactcaaa cacatcctca actcgatata aatcacgaaa	780
cctgatcaag ataaccccga ctacttaaaa tggtagatc tccaacctcc caactccgtc	840
ttgtacattt cactcgccag tttcctatcc atttcccgag cccaaatggc tgaactcgca	900
accggaatac gaaactctgg tgtccgttt ttgtgggtgg cacgtggcga aacaaaccgg	960
ttgaaagaga tttgttgtga tcatgaaaag gggctgatca tagaatggc cgatcaaatg	1020
caggttctt ctcattttc ggttgggtgg ttcttgcgc attgtgggtt gaattcgact	1080
aaagaggcgt tcatggccgg ggtgccgtt ttgactattc caattatgtt tcatggatg	1140
tctaacgcga aggccgtcgt ggaagattgg agggtgggtt ggagggtggt gaatgagtt	1200
aatgaagaag agtgggtggg aggagatgag attgcataa ttgtggagg gtttatggat	1260
atggaaaatg gtgagaggaa agagttgacg aaaaatgtga aagaggtgca gaagatttgc	1320
gcgagagagt tcgaagatgg agatggacag tcgtttgagt ttaatgttga aagtttgggtt	1380
caattgattc tgcaatttggg tccgtaa	1407

&lt;210&gt;19

&lt;211&gt;1428

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1609

&lt;400&gt;19

atgaacaaca caaccaaca acaaacagta gcattagcac tagcacctca ctgtttaatc	60
--	----

<210>20  
<211>1425  
<212>DNA  
<213>  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>pSPB1617  
<400>20

atgtcttagtg agagccaaat aaacttagtg ttcatccctc tccctgtaaa gggacacatt 60  
gtctcaacgc tagagacggc aaagctactc gtcgatcgaa acaaacgcct caccatcaca 120  
atcctcctca tgaagctgcc agtcgacgcc aaggtagatg attcccttac aaaaaatccc 180  
tcctgctctc aaataacttt tgtacatctc cctcgaatcg agcacagttc catggaacca 240  
ccgggaactc ccgaatcctt tgtacacagg ttcgtcgaga gccaaaaatg tctcgtaaaga 300  
gatgcgggtgg ttaaagcaac ggagggctca aaatcaaaca ggctagccgg atttgtaaatc 360  
gacatgttct gcaccccgat gattgatgtg gccaatgaat ttggcgtccc gacatacgtg 420  
gctttcacgt ccggggccgc aactctcggg ctattgtcc atttgcagag tcttagagat 480  
gaatttaatc aggacgtgaa ggagtacgag aactcggaaag ttgagatatc gatcccggt 540  
tatgttaacc cggtcccttc caaatccttg ccgtctcctg tcttcaacga ggacgggttt 600  
tttcttagtc ttgcaaaggg gttcagagag gctaaaggtt tattgatcaa cacctttta 660  
gaatttgaat cccatgccat taaatcgctc tccaacgatg cgagaatccc gcctgtttac 720  
cccatcggtc cagtaattca cgccacggaa gataatgcaa acaaaggaaa gcaggacgaa 780  
atcatcggtc ggcttgacga gcaacctgat tcatccgtcg tgtttcttgc ttcggaaagc 840  
gctggatgct ttgaagaaaaa tcaagtgaag gagattgcag tggcgctcga caaaagtgg 900  
taccgggttt tatggtcatt gagaaagccg cctcccaaag aaaaagcggg gttccaggg 960  
gagtacaaag attttaatga agtttacca gaagggttct tacaacgtac gtccgggaga 1020

ggtaaggtaa taggatggc tccgcagatg gccgtgttgt ctcacaatgc ggtgggagga	1080
ttcgtgtcgc attgcggctg gaactcgacg ttggagagtg tttgggtgcgg agtgc当地	1140
gccgtgtggc cattggcggc cgagcaacat gcgaacgcgt tccagtttgt gaaggagttg	1200
ggaattgcgg tggagattaa gatggattat aggaagaaca gtgggtgtat tgtggaggca	1260
aaaatgattt agaaaggaat cagggagtt atggacccgg aaaatgagat aaggggtaat	1320
gtgaaagtga tgaaaaagga gagtaggaNa gctgtcgtgg atggggac ttctttgtat	1380
tacttggatc gtttgttga aactgtcgtg aataatgtt tgtga	1425

&lt;210&gt;21

&lt;211&gt;1446

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1615

&lt;400&gt;21

atgggttccg tagccggaaa cagttacaaa cggcctcatg ctgtgtgcat acccttccc	60
gcgcaggggc acatcaaccc catgctgaag ttggccaaac tcctccacca aaaggccttc	120
cacatcacat tcgtcaacac agatcacaac caccgcgcgt tgctcaagtc cctcgcccc	180
gacgctctcg atggcttgcc ggatttccga ttgcacca tccccgacgg tcttcctccg	240
tctgacgcgg acgtcactca ggatgttct tctttgtt tgtccaccac taacacttgc	300
ttggagccct ttaccgagtt gctgttggaaa ctcataact ccggcccgga cgtgccaccg	360
gtgacctgca tcgtctcgga tgggtgtcatg agcttcacat tgaaggcggc ggagaggtt	420
gcgctgcgg aagtgcgtt ctggacgacg agtgcgtgt gtttcttgc gtacacgcag	480
tataagcgtc tcttggagaa aggctatgtc cctctcaaag atatgagcca gttacaat	540
agctatctgg aaacaaccct cgactgggtt ccaggaatga aggatatccg attaaggac	600
ttcccatcat tcatcaggac aacggatcca aaagacatca tgtacaattt cgtattaca	660
gaaaccgcacg ctgtctccag agccaaagct ctgatcatca acacccttca tacattggaa	720
cacgacgtt gaaatgcct ctccaccatg tttccacgtg tttacaccat cggctcttt	780
cagctgatgt tggaccaagt tcatgacaag agcctaacg ccatcaactc caatcttgg	840
aaagaagaat cgcaatgcat cgattggctc aattcaaaag agccgaatc cggtgttat	900
gtgaatttgc gtagtgtcac tgggtgtact gctcaacaac tgacggatt tgctggggg	960
cttgcgaaca gcaacaagac tttttatgg gttatttaggc ctgatatagt tggtaggac	1020
tcggcaatgc tgccccctga attcttgcac gacacggaag acagaagcat gctaataagc	1080
tgggttaacc aagaacaggt gttgaggcac cttccatcc gaggatttt gacgcacagt	1140
ggttggact cgacgcttga aagtattgtc agcggagtgc ctatgatatg ttggctttc	1200
tttgctgagc aacagacaaa ttgttagttc agttgcgtgg aatggaaat aggaatggag	1260
attgacaata atgtgaagag agatgagggtt gaggtgtctgg tgagaggtt gatggatgtt	1320
gaaaagggaa agaaaatgaa gaagaaagct atggagtggaa agatgaaagc agaagcagca	1380
gctccccctg ggggaccttc gtcttaaat ttggaaaaac ttattgagga ggtgttttg	1440
caataa	1446

&lt;210&gt;22

&lt;211&gt;1308

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB660

&lt;400&gt;22

atgaaggctc atgcagtgtat gcttccttgc cccgtacaag ggcacttaaa tcctatgctg	60
aaactggcca aaatattgca ttcaagaggc ttcttcata cattcgtgaa cacggaattc	120
aatcacaatc gtcttagtgcg tgcgagaggc cccgaatctg ttaaaggctg cgatgatttt	180
cagttcaaaa ccataacctga tggactaccg cctttgata aggacgcaac gcaagacata	240
cctcaactgt gtgattctct tcaaaaagaat ggtctccctc cattgttgaa cctcattaaa	300
agtattaaatg attcacccgga ctgtccaaat gttacctgta tagtattgttta tttggccatg	360
agtttcgctc ttgatgcggc cgaggtgttc aaaattccca cgggttactt ttgcctaact	420
agtgcctgtg gattcatggg gttttgcaat tatgaagagc ttgtgaatcg aggattgttt	480
ccacttaaaatg atgaaagtca aataactaat ggctatctt ataccaaact agactgggt	540
ccagggatga agaacattag gctcagagat ttccctagtt tcatccgaac gactgatcca	600
gatgatatca tggtaactt catgattttt aacatgaaga atgcgcctcg tgcaaaggct	660
gtggtagtca acacattcga tgaattggag aaagatgtat tggaggccct aagtaaaaaa	720
tttgcatttgc ttttttccat aggcccactc caattgtatgg agaaggctt cccaaaggct	780
gaggtaaaat ctataggatc aagcttgtgg aaagaagaca acacgtgcat cgcctggctc	840
aacggcaggg agccaaattt tggttgtac gtgaactttt gaagcatcac agtgttgtca	900
cctcaacaac tattggagtt cgcatgggc cttagccaaa gcaaccatta ctttttgtgg	960
atcataaggc cagatttggg aagtggagaa tctgcgattt tatccgaaga gtactcaaag	1020
gaagttgaag ggccggcgat gatggtgcgt tgggtcttc aagagcaatg attggccat	1080
ccttcggtag gtggattctt gacacattct ggcttggact cgactatcga aggaatgtca	1140
gaaggtgttc ctatgatttt ttggccctttt tttgctgacc aacagaccaa ttgtcggtat	1200
gcatgcacgg agtggggagat tggaaatggag attgaaggag aggttacgag ggataaaatg	1260
gcggatttgg tgaaaatattt gatggaggag ggaaggggag agcgtatga	1308

&lt;210&gt;23

&lt;211&gt;1506

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB658

&lt;400&gt;23

atggccatttcaatggccat atgaacaaaaa acctcacttt gtcctgttcc ctttcatggc acaaggccat	60
atgattccca tggtagatcgccagatccaatgcgcaagc gcgggtgtcac aatcaccatt	120
ctactcacac cccacaatgc caacagggtc aaaacagtca ttgctcgtgc aatcgattca	180
ggactaaata tcaatgtcat ccacttcaaa ttccatccg ttgaggtcg attgcccggaa	240
ggttggata atttcgatat gctccctgac atcaatggcg cattgcgtt tttcaaaagcc	300
actttcatgt tacaagaaca ggctcgaagag ttgcgttccaa agctcgagcc tcttccgagc	360
tgcctaatttgcgttccatgg acaacaaatc ttgcgttccaa gttaaatgtt	420
ccaagaatttgcgttccatgg gacaagggtcg tttctctcc tatgtatgca cgtttttagga	480
actttctaaagg atttcgaaagg tggactaac gaaacggagt acttccttgcgttccatgg	540
ccagataaaaa tcgaaataac caaaaattcgttccatgg cccttattca aatgaattca	600
gactggacga agttcgttccatgg tgaggtcgaa gaggctgagg taaaaggcatt tgaaacgggt	660
gccaataactt ttgaaatggatggccatgg ggaaccagag tatgtcaatggccatgg	720
aaaaaaatgttccatgg ggtgcataagg tcctgttccatgg aatgcgttccatgg	780
gaaagaggttccatgg acatggcttc aatcgacgcgca caccatgttccatgg tgaagtggcttccatgg	840
gaacaaaaatgttccatgg ctgttatttgcgttccatgg ggaaggccatgg cttccatgg	900
ctgtatggccatgg ttgatggccatgg ttttgcgttccatgg ggttagttttgcgttccatgg	960

gatccatcac aagaacttaa aaaatggttt ttgaatgaga aatttgagga aagggtaaag	1020
gatagaggcc ttttgcataa cggttggcg cctcaagtgc tcatacttc ccatccatct	1080
tttggagggt ttgttaacgca ctgcggctgg aactcgatgc ttgaagggt tacttcaggc	1140
ttgccatgtca taacgtggcc tgtatttgc gaggcgttt gtaatgaaaa gtttattgtt	1200
cacgtatca agactggat aagagtgggt gttgaagtgc ctatcatctt tgagatgaa	1260
aaaaaaagtgc gagtttggt gaagaatgat gagataaaga tggtataga taagttgtat	1320
gatggaggag aagagggaga agagagaaga gagagagctc aaaagcttgg agaaatggca	1380
aaaaaggcca tggaggaggg tggttcttct tatcataatt tgacatcggt catgcaagat	1440
gtcatgtatgc aacaagctaa taatggagat caatatgaag atggtgttac agttataaat	1500
acatga	1506

<210>24	
<211>30	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Primer 1617BamHINcoI-FW	
<400>24	
gggggatcca tggctagtga gagccaaata	30

<210>25	
<211>36	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Primer 1617XhoIKpnI-RV	
<400>25	
ccccctcgagg gtacctcaca aaacattatt cacgac	36

<210>26	
<211>24	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Primer 1617-F	
<400>26	
atgggagaag aatacaagaa aaca	24

<210>27	
<211>26	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	

<222>  
 <223>Primer 1617-R  
 <400>27  
 taaaatttgg tagttaaacc gatgta 26

<210>28  
 <211>1386  
 <212>DNA  
 <213>  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>pSPB1721  
 <400>28

atgctgagcc tcgccaaaat	tctgcaccaa aagggattcc atatcactt	cgttaacact 60
gaatttaacc atgaacgcct	cctgagaacg agaggcccga	attcccttga cgggttgccct 120
tcgtttcgat tcgagacaat	tcccgacggt cttccgccat	cagacccccga tgctacacaa 180
aacgttgcac tattgttga	gtccagcaca tccaaatgct	tagtccatt cagggacctt 240
cttgctaagg taaccacac	cgacgtgccg ccagttactt	gcatactatc cgacttaatc 300
atgagcttca ctcttgaagc	tgctcaagag ctcagcatcc	ctgatgtcct ttttggacc 360
gctagcgctt gtggatacct	cgcttatgca cactatgcca	cgcttattga aaaaggattt 420
acaccttca aagatacgag	ttgcttgacc aatgggtatt	tggataccgt tattgatgat 480
attccttagtc tggaaggcat	acgtctgaga gacattccaa	gttttatcag aacaactaat 540
ccagatgaca ttttgatgaa	cttgtgttg cgagaaacag	agagagctag aaaaggttcc 600
gccgtaatct ttaacacggt	cgagtgcctc gaggttgaag	cattaaacgt actttcatcc 660
atgttgccctc cagtttacac	agttggaccc ctgcatttgg	ttgaaaagca tggatgtcac 720
aaaggatgg aggtgcttgg	atcaaatttta tggaaagaag	agccaaaatg tctcaatgg 780
cttgactccc aaattcccaa	ctcagtggtt tacgtaattt	ttggaagcat cgctgtcatg 840
acaactgacc aactgattga	gttttcttgg ggtcttgcta	atagcaacat atccttctt 900
tggattataa gacctgaccc	tgtctcaggg gaaaacgcgt	ttctccacc cgaatttctc 960
gaagccacaa aagaaagagg	ttctccacc aattgggtgcc	ctcaagagaa agttcttagc 1020
cacccatcca tcagaggatt	cttaactcac agcggatgga	attcaactct tgagagcatt 1080
tcagtgag ttccaatgat	cagttggccg ttcttcgcgc	aacaacagac taactgttgg 1140
ttttgctgca caaaatgggg	cataggcata gagctagaca	atgatgtcaa aaggataaaa 1200
gttggaaagacc ttgtgcgcga	attgatgtct ggggataaag	ggaaagagat tataaaaatg 1260
gctatggagt ggaagaagct	ggccgaagag tctgcccaga	gttcatctt taagaatcta 1320
gagaaagtga ttcatgaagt	gttcatctt ccactacaag	tgtggatcc taaggattcc 1380
acctaa		1386

<210>29  
 <211>1374  
 <212>DNA  
 <213>  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223>pSPB1724  
 <400>29

atggaggaca ctatcggtct	ctacgcttca gcagagcacc	ttaactccat gctactactc 60
ggcaaaactca tcaacaaaca	ccacccacaa atctccgtcg	ccattatcag caccgcccc 120

aacgccgccc	ctagttccgt	cggccat	actcaaaccg	180
gccactctcc	cttcggatct	aaccaaaaac	aatcccacgt	240
ctacataatc	ctaacttgct	cgaaggcgctg	300	
gcatttgc	tagatttctt	tttgcactag	360	
cccactta	tctatgtcag	cagcggcg	420	
acaatcgacg	aaactgtcga	aaaagacatc	480	
ggttgc	cggtttgtc	ccgaaaggta	540	
acttacaagc	atttttaga	aacatgagga	600	
aacgcctcg	acgcgtatgga	gagcgtgg	660	
cccaattcgc	caactcccc	tttggctat	720	
acgaaaacca	caaacgaaca	tggttgc	780	
agcgtatct	tcttatgtt	ccgcagatc	840	
atcgcaattg	gtctggagaa	tttggccat	900	
agtaagccta	actttataa	tttggccat	960	
tttgtccagga	ccgagacccg	tttggccat	1020	
ctgagccatg	gggtttcg	tttggccat	1080	
gcgtgtcgt	atcaagtct	tttggccat	1140	
agggtgtca	gggtttcg	tttggccat	1200	
ttcgtggcg	tttggccat	tttggccat	1260	
agagcgtta	tttggccat	tttggccat	1320	
ggtgttcgt	tttggccat	tttggccat	1374	

&lt;210&gt;30

&lt;211&gt;1362

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1723

&lt;400&gt;30

atggaggcag	acaaagaaaa	tctcaagatt	ttaatgttcc	catgttggc	tcatggcat	60
atatttccat	ttctttagt	agccaaaaga	atcttgaagc	gaaaaactg	gcacatatac	120
tttgttacca	cagccataaa	cttcgttct	atcaacaact	tcattgaaaa	atataagt	180
gagaactcaa	tagaagttagt	agaactccat	atagaaccat	cccctgaact	tccacctcat	240
taccacacta	caaagaattt	gccaacaagt	ctcaattcta	ccctattaaa	ggccattcag	300
acgtcgaatt	cgagcttctc	agacatcatc	agaacattga	aacctgaact	agtgatatat	360
gatgtgttc	aaccttggc	tgccaagatt	gcttcctcac	aaggattcc	tgctgtttat	420
ttttcttagt	ttggaggggc	accattatca	cttatgcac	atcaccacac	gtacggaaaa	480
cccgaattt	ccttccaagc	aatagttgtt	gaggacatcg	aactggaaag	tttgctct	540
ttgtttgatt	tcttgtatgc	caacatattt	gaagtggatc	aagattatct	ttttggaaat	600
ttcaagcaat	tttgtgagct	tttttgttta	aagagttagt	aaggattga	gaggaagtac	660
atcgattatc	tttcatctt	gtctcagaaa	aaaatattac	ctgttggacc	actagtccac	720
gttgcacata	agaccaatga	ggagaattcc	gagatcatga	attgggttag	caagaaaaaa	780
caccattcaa	ctgtctacat	ttccttcggt	agtgaatact	tcctgtctaa	agaagagatt	840
gaagagatag	caaaaaggct	tgagcttgc	gatgttaact	ttatatggat	catcagattt	900
ccagttggag	tgaccgttaa	cttagaagaa	acactgcctc	aaggttcct	tcaaagggtg	960
aacgaacggg	ggatgggtgt	ttcaggatgg	gcaccacaga	gcaacatatt	agcacatcca	1020
agcacaggag	gtttgttag	tcactgtggg	tggagtctt	tcacagaaag	cgtatattt	1080
ggtgtccgg	tcatagggat	ggcaatgaaa	cttgatcagc	caataaacgc	cagaatgtt	1140

tcagaggctg gtagttgtgt cgaagtcaaa agatatgaaa atgaagtgtt tagggagaa	1200
gagatagcga aggcgataaa gaaggtgatt gttgaggaca gtggagaaag gctgcggcaa	1260
agagcttag aattgagcga gaagatgaaa atggaagagg aaaatgagat ggatgaagta	1320
actgagcagc tgtggagct ttgcttgacg aaaaaacggt aa	1362

&lt;210&gt;31

&lt;211&gt;1437

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;pSPB1719

&lt;400&gt;31

atggaacctc atatagttat attcccggtc atgtccaaag gccacacaat ccctctcc	60
cacccctccc acccctccct tagtcgcgga gtacgcgtaa cgatcttcac cactgcacaa	120
aaccaccctt tcacgcgtca acatgtccca aaaacaaaata atgttaccat cattgaccta	180
ccgttccctg ataacatccc tggaaatttca ccaggaacgg agagcacgga caaactcccc	240
tcgatgtctc tctcgtccc gttcgtgaac gccgctaaat cgatgcaacc gttctcgaa	300
gatgagctt agaaaattca ttccagggtt agttgtgtt tatccggatgg ttttcttcat	360
tggacgctga aatcagcgtc caagttcgga attccacgac tgagtttcta cggtatgagc	420
tactatgcct tgacaatttt tcgagtcgtc atctcaaaca agttaatatc attgcacgag	480
tcaccgcacg aggcatcactt cttaccttagt ttcccttggta tttaactcac tagagatcac	540
ttcgacaaac cacttgcata acgtgaacca aatggtccgc aatttgactt tttcatggaa	600
gcaacgcacag ctactgtgaa tagctatggt ttcttagtga atagcttcta tgagcttggaa	660
ccaacttcg cggattacta tgacaacaat tacaaaccca aggctggag tgcggccct	720
ctctgcctcg cacaaacgcc aaagaatgat aatctctcg cgaagcctga gtggattcat	780
tggcttgacc aaaagttgga acaagatcgc cctgtttgt acattgcatt cggatcacaa	840
gcagaaatta cactagaaca gttacatgaa atctcacgag ggttggaaaga gtcaaatgta	900
cacttttgtt gggtttaag gaacaatgga gttgaactaa gtgtatggatt tgaagacagg	960
gttaagaata gaggaattgt agtaaaagaa tgggttgatc aaagagagat tcttgaacat	1020
gaaagtgtaa aaggcttct aagtcatcgc ggctggaaatt cggtaatgga aggtatatgt	1080
gcggagggtc tgattcttgc gtggccatg atagcggagc aacactgaa tgcaaagatg	1140
gtgagtgaag aaataaaagat tggtttggaa gttgaaacgg ttgtatggaaac ggcaaaggaa	1200
tttgtgactg cggcgagtt gacgaaggcg gtgtatggaaat tgatggaggg tgagaagggg	1260
aaggaattga gggagaatgt gaagaaatgt gcggggccag cgaggaaagc ggtggatggaa	1320
ggtggttcgt cgtggatgg tttgaatgaa ctcattgtat aggtgtgttag gcataaggaa	1380
atgagtggta gttctaaagt tgatgaaaac aagaggaaa ttaaggatataattaa	1437

&lt;210&gt;32

&lt;211&gt;24

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;

&lt;222&gt;

&lt;223&gt;Primer 1725-NcoI

&lt;400&gt;32

cccatgggag aagaatacaa gaaa

24

<210>33  
<211>26  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence

<220>  
<221>  
<222>  
<223>Primer 1725-KpnI

<400>33

ggtaacctata aaatttgta gttaaa

26

<210>34

<211>1080

<212>DNA

<213>

<220>

<221>

<222>

<223>GAPDH

<400>34

caccgattac atgacgtaca tggcaagta cgacagtgtt catggcagt ggaaacacca	60
cgaggtaag gtacaggatg agaagaccct tctgttgtt gaaaagccag taagagtctt	120
gtcaactggt gtcttcacgg acaaagataa ggctgctgct cacttgaagg gtgggtccaa	180
gaagggttgt atctcagcac caagcaaaga tgccaccaatg tttgttgtgg gtgtcaatga	240
gaaggaatac aaaccagagt tggacattgt ttccaatgct agttgcacta ccaattgcct	300
tgcgccttg gccaaaggta ttaatgatag atttggatt gttgagggcc tcatgaccac	360
cgtccactct attaccgcaa ctcaaaaagac tgtcgatggg ccatcgagca aggactggag	420
agggtggaga gctgcattgt tcaacattat cccccagcagc actggcgcag ctaaggctgt	480
tggtaaagtg ctcccagttc tcaatggaaa gctaacggga atggccttcc gtgtccctac	540
tgtcgatgtc tccgtgttgg acctcactgt caggcgtcag aaagaggcca cttatgatga	600
gatcaaagct gctatcaagg aggaatccga gggcaacctt aagggcattt tgggctatac	660
cgaagatgat gtgggtcaa cagacttgc tggtgatagc cgatcaagca ttttcgatgc	720
caaggctgga attgcattga gcaagacgtt tggtaagctt gtgtcggtt acgacaacga	780
atggggttac agtcccggt tgatcgacct gatcgtgcac atggcctcag tttctaaaggc	840
ttgatcgat atctgcattt gccgtgaagc agctttgtc ttatcgatc ttttctgatgt	900
ttgtataaat gggctttgt gttatttgca gcctaatttt gcagtttgca aatttatgggt	960
ttttggttat gtttgctga aacctatttt attaccctt cgcgtgggt tattgaatgt	1020
gaactcttt tactgatgtc tttaacgttc tctctttaa aaaaaaaaaaaaaaaa	1080

<210>35

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Primer AmGAPDH-F

<400>35

tgttgctgtt aacgatccat

20

<210>36 <211>18 <212>DNA <213>Artificial Sequence <220> <221> <222> <223>Primer AmGAPDH-R <400>36 agctcttcca cctctcca	18
<210>37 <211>24 <212>DNA <213>Artificial Sequence <220> <221> <222> <223>Primer AmAS-F <400>37 atgttcaaaa atcctaataat ccgc	24
<210>38 <211>25 <212>DNA <213>Artificial Sequence <220> <221> <222> <223>Primer AmAS-R <400>38 tttagccatca agctcaatct tgaca	25
<210>39 <211>16 <212>DNA <213>Artificial Sequence <220> <221> <222> <223>M13 reverse primer <400>39 aacagctatg accatg	16
<210>40 <211>24 <212>DNA <213>Artificial Sequence <220> <221>	

<222>  
<223>Primer ThDFR-NcoI  
<400>40  
gctttaccat ggagtaatga gctt 24

<210>41  
<211>1367  
<212>DNA  
<213>  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>pSPB266(ThF3H)  
<400>41

gtatgtatgt atgtatgcta tatacgagtc gataaagtgc atcgaaaaatca ttttcgacaa	60
atacaacacct cgtgagagaa ttctctcgat catatggcac gagcaggacc actaacccta	120
acttcgctag cgctcgagaa atcgctgcatt gaaaagttta taaggacga agacgagagg	180
cctaacttag catacgatca atttagcagt cagattccat tgatctctct ctctggatc	240
gacgatgaat gtaataagag gaaagagctg tgcaagagaa tagcgcaggc atgcgaagat	300
tgggttattt ttcaagtgtat cgatcatggg atcgatttga aactcgtcaa cgatatgact	360
cgttggctc gtgagttctt cgatttgcgg gacgaagaga agctgagggtt cgatatgtct	420
ggtggagaa aaggagggtt cattgttgc agccaccttc agggcgaggt ggtccaagac	480
tggcgcgaga tcgtgaccta cttcacatac cctatcaaag gccgtgacta ttccctgtgg	540
cccgacaagc ccgaggcatg gcgggcccgtg acagagaccc acagctcgca gctaattgtgc	600
ctggcgtca aattgcttagg aatcctatcc gaggcaatgg gcctcgaaag agaagcgtcg	660
accaaggcct gtcgtacat ggacaaaaaa gttgtggtca acttttaccc aaaatgccct	720
cagcccaatt tgacattggg cctgaagaggg cactcgacc caggtttgat cactctgtcg	780
tttcaggata acgttggcgg gcttcaagcg actcgagacg gcgggaagtc gtggatcacf	840
gtccagcccg ttgagggtgc attcgtggcatt aatcttggtg atttgctca ttacttgagc	900
aatggaaaggt tcaagaacgc ggatcatcga gcgggtggta attcaaacac gaatagaatg	960
tcgatcgcga cgttcaaaaa cccatcgcca gaggctatcg tgtaccctct caagatcgga	1020
gacgacggga agcccattat agaaaagccc atcacttatg gagaaatgta caagaggaag	1080
atggctaaag acattgaact tgccaaagctc aagaagctag ccaaggaaca aaagtgc当地	1140
gaagaagttt ttaataatgt tgaagatcat catcttaaca atggaaaac taaaataggag	1200
gttaaggct ttaaggaaac tgacgtgtc ttgtgattgt tatatattct ctatgtcgta	1260
ttcgtcttaa ggtgtcaga tgaaaatatc gaccatgtta ggtatataat ttatatgaat	1320
tgtattgcct agtcggccat attatgatta aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa	1367

<210>42  
<211>22  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>Primer ThF3H-SalI-1  
<400>42  
ttctctgtcg acgcccattg cc 22

<210>43

<211>22  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223>Primer ThF3H-SalI-2  
<400>43  
cgccgtgtcg actcgcttga ag

22

【書類名】 図面  
【図1】

図1

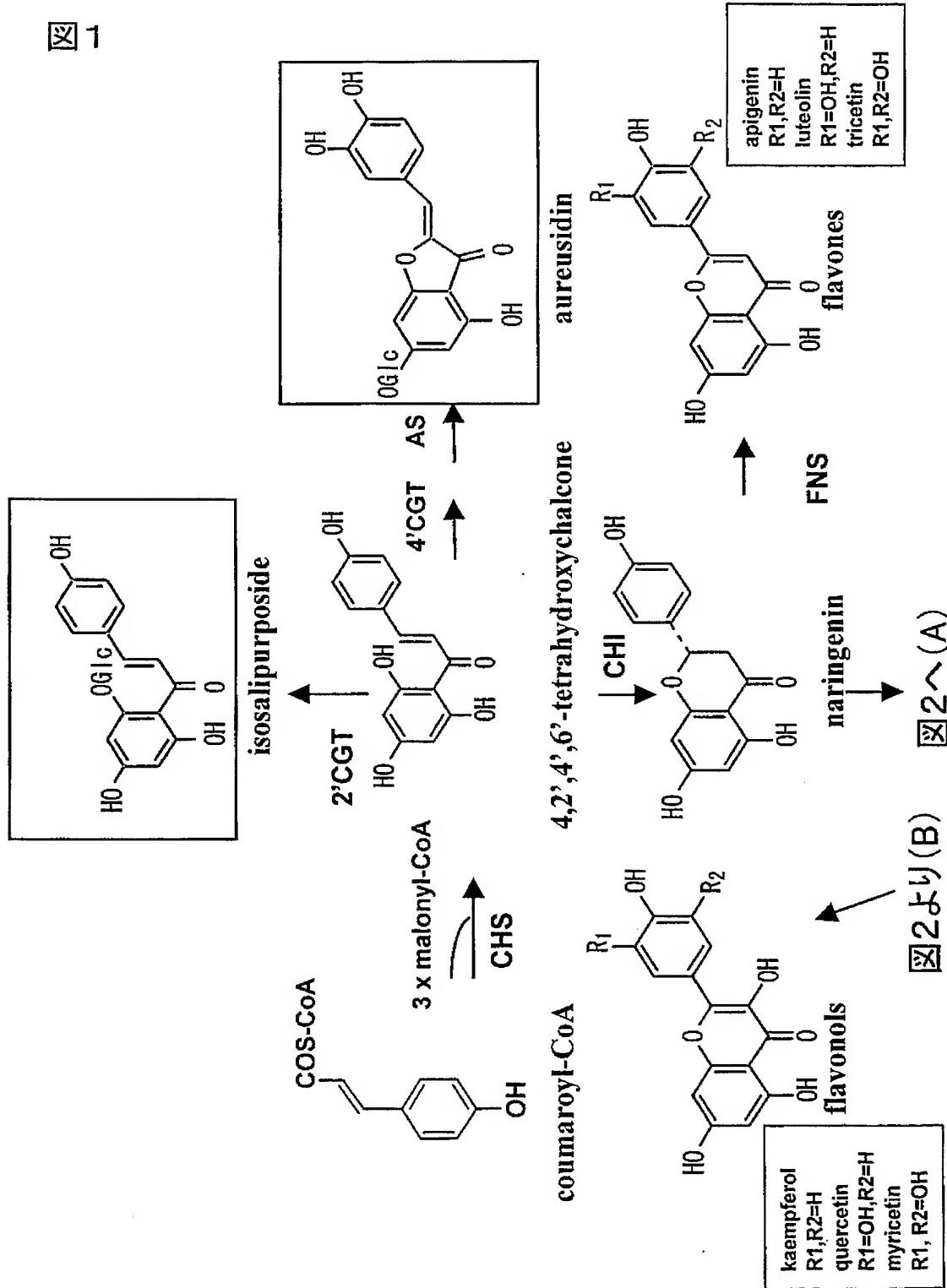
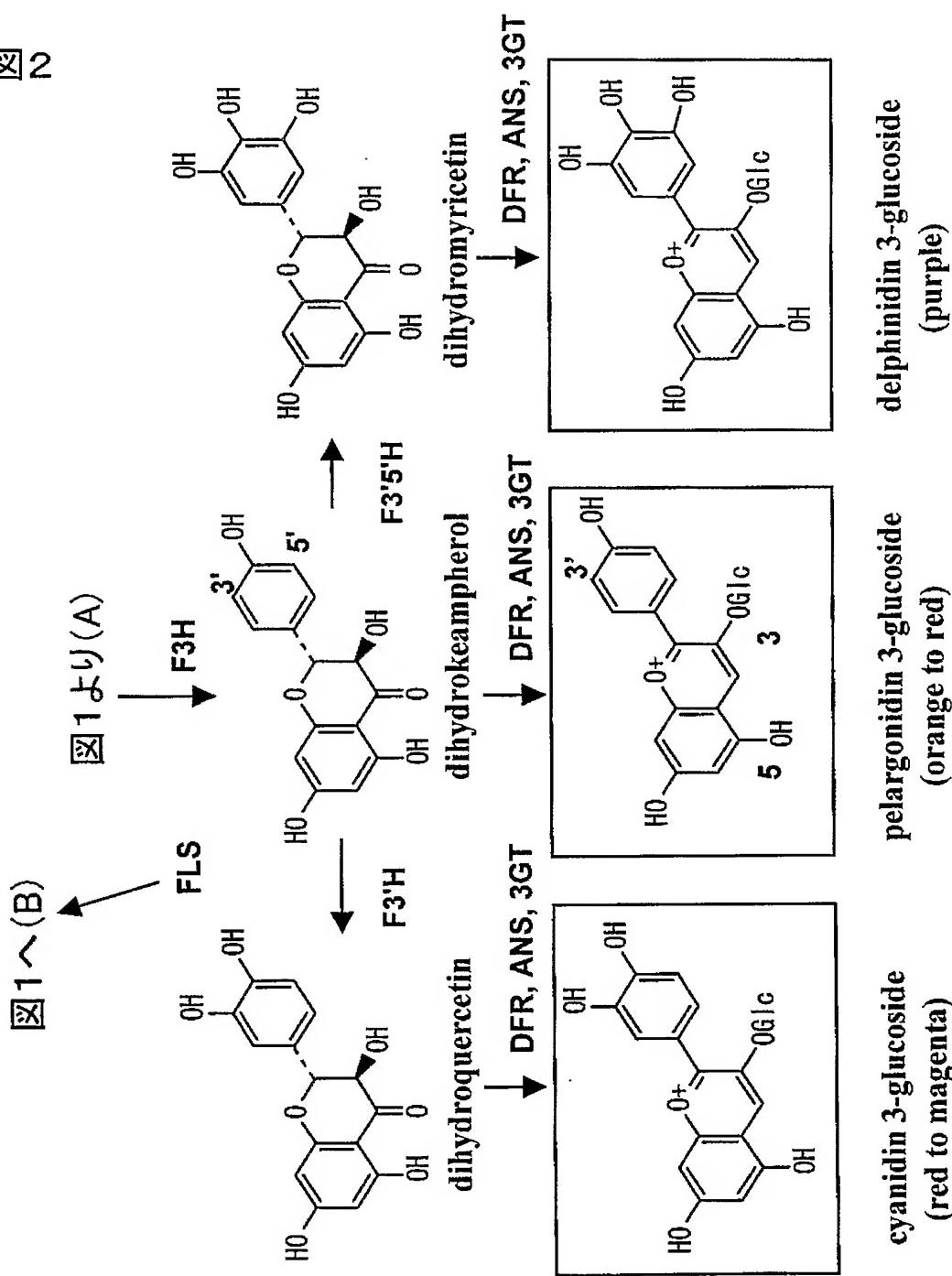


図2より(B) 図2～(A)

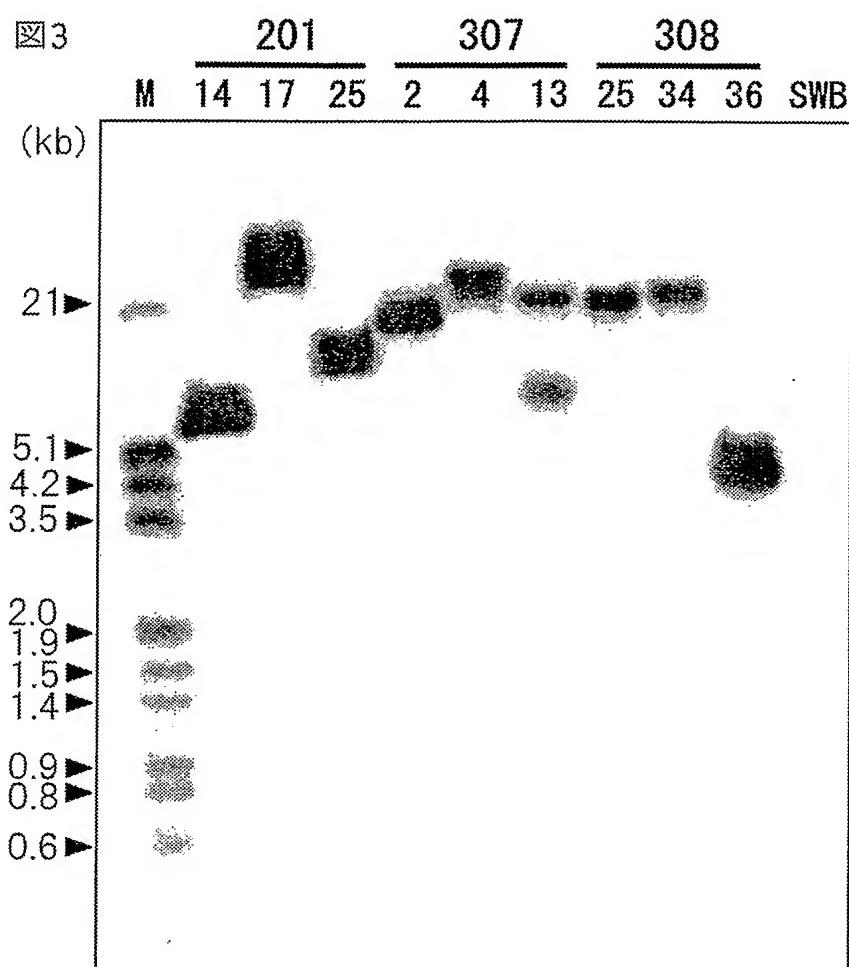
【図2】

図2

図1より(A)



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 カルコンの4' 位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の提供。

【解決手段】 例えば、配列番号：2に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を提供する。この4' 位CGT遺伝子とオーロン合成酵素を、本来オーロン合成能のない植物において共発現することにより、オーロンを蓄積することに成功し、花色が黄色味を帯びた色に変化した。さらに、両遺伝子の発現に加えて、宿主植物自身のフラボノイド色素合成系を制御することで、より鮮明な黄色の花を得ることができた。

【選択図】 なし

特願 2003-420046

出願人履歴情報

識別番号

[000001904]

1. 変更年月日

1990年 8月13日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

氏 名

サントリー株式会社

特願 2003-420046

出願人履歴情報

識別番号 [502275942]

1. 変更年月日 2003年 4月28日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都千代田区平河町二丁目13番12号  
氏 名 サントリーフラワーズ株式会社